Isolation und Charakterisierung von Kopiezahlmutanten des Plasmids Mini-F zur Konstruktion von Mini-F Klonierungsvektoren mit variabler Kopiezahl

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

der Abteilung für Biologie

an der Ruhr-Universität Bochum

von

Jürgen Ebbers

aus Marl

Bochum 1983

Isolation und Charakterisierung von Kopiezahlmutanten des Plasmids Mini-F zur Konstruktion von Mini-F Klonierungsvektoren mit variabler Kopiezahl

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Jürgen Ebbers
aus Marl

Bochum 1983

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen der Ruhr-Universität Bochum unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Eichenlaub angefertigt. Ihm danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für seine vielen wertvollen Ratschläge und die konstruktive Kritik bei der Planung und Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. U. Winkler möchte ich für die Bereitstellung eines Labors zur Promotion an seinem Lehrstuhl danken.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dipl. Biol. M. Helsberg für die freundliche Überlassung gereinigter Bakteriophagen-DNA von M13mp8 und M13mp9, für seine Einführung in die Techniken der DNA-Sequenzierung und für seine Kooperation bei DNA Sequenzierung verschiedener Mini-F Mutanten.

Abschließend sei erwähnt, daß die Mini-F Derivate pLE701 und pLE702 im Rahmen eines S-Blocks von dem Studenten Herrn N. Lamm konstruiert wurden.

Liste der im Text verwendeten Abkürzungen

Ap	Ampicillin
Ap^r/Ap^s	Resistenz/Sensibilität gegen Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
am	amber
bp	Basenpaare
Cm	Chloramphenicol
cpm	Zählimpulse pro Minute
cop^-	Defekt der Kopiezahlkontrolle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
Δ	Deletion
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
Kb	Kilobasen - 1000 Nukleotidpaare
log-Zellen	Bakterienkultur in der Phase logarithmischen Wachstums
Md	Megadalton
MG	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv
t-RNA	Transfer-RNA
Upm	Umdrehungen pro Minute
VE	Volumeneinheit
w/v	(engl.) weight per volume
w/w	(engl.) weight per weight
ÜK	Über-Nacht-Kultur

Inhaltsverzeichnis Seite

1. Einleitung

1.1. Plasmide-Definition und Verwendungsmöglichkeiten - 1 -
1.2. Der F-Faktor - 3 -
1.3. Die Replikation von Plasmid-DNA - 6 -
1.4. Regulationsmodelle für die Plasmid-Replikation - 8 -
1.5. Verteilungsmechanismen bei Plasmiden - 10 -
1.6. Inkompatibilität bei Plasmiden - 12 -
1.7. Das Plasmid Mini-F - 13 -
1.8. Problemstellung - 22 -

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide - 27 -
2.2. Nährmedien - 27 -
2.3. Puffer - 30 -
2.4. Enzyme und Chemikalien - 32 -
2.5. Isolation von Plasmid-DNA - 34 -
2.6. Präzipitation von Nukleinsäuren - 35 -
2.7. *In vitro* Mutagenese von Plasmid-DNA mit Hydroxylamin - 36 -
2.8. Hydrolyse (Fragmentierung) von DNA mit Restriktionsendonukleasen - 36 -
2.9. *In vitro* Neukombination von DNA-Fragmenten - 37 -
2.10. Agarose-Gelelektrophoresen - 38 -
2.11. Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten - 39 -
2.12. Behandlung von DNA-Fragmenten mit Nuklease S1 - 40 -
2.13. Linkerung von DNA-Fragmenten - 41 -
2.14. Transformation von *E. coli* Stämmen - 42 -
2.15. Klonanalyse - 44 -
2.16. Kopiezahlbestimmung von Plasmiden - 45 -
2.17. Test auf Inkompatibilität - 47 -
2.18. Test auf Segregation von Plasmiden - 47 -
2.19. Sequenzierung von DNA-Fragmenten - 48 -

3. Resultate

3.1. Isolation von Mini-F Mutanten mit erhöhter Kopiezahl - 56 -
3.1.1. Isolation von Mini-F Kopiezahlmutanten - 58 -
3.1.2. Isolation thermosensitiver Kopiezahlmutanten von Mini-F - 62 -

3.2.	Charakterisierung der Kopiezahlmutanten von Mini-F	- 65 -
3.2.1.	Untersuchung der Segregationseigenschaften der thermosensitiven Kopiezahlmutanten pJE139 und pJE3022	- 65 -
3.2.2.	Kopiezahlbestimmung von Mini-F Mutanten	- 66 -
3.2.3.	Inkompatibilitäts-Eigenschaften der Kopiezahlmutanten von Mini-F	- 69 -
3.3.	Konstruktion von Mini-F Klonierungsvektoren mit thermosensitiver Kopiezahl	- 72 -
3.4.	Kartierung der cop- und cop_{ts}-Mutation von Mini-F pJE3021 und pJE3022	- 77 -
3.4.1.	Kartierung der cop-Mutationen von pJE3021 und pJE3022	- 78 -
3.4.2.	Kartierung der cop_{ts}-Mutation von pJE3022	- 83 -
3.4.3.	Charakterisierung der cop_{ts}-Mutation von pJE3022	- 87 -
3.5.	Kartierung der amber-Mutation einer Replikations-defekten Mini-F Mutante	- 88 -
3.6.	Feinkartierung der cop- und amber-Mutationen von Mini-F Plasmiden durch DNA-Sequenzierung	- 91 -
3.7.	Komplementation der thermosensitiven Mini-F Kopiezahlmutante pJE253	- 94 -
3.8.	Isolation und Charakterisierung von supprimierbaren Mini-F Vektoren mit thermosensitiver Kopiezahl	- 99 -
4.	Diskussion	- 104 -
4.1.	Die Isolation und Charakterisierung von Kopiezahlmutanten des Plasmids Mini-F	- 105 -
4.2.	Die Gen Loci der cop- und rep_{am}-Mutationen von Mini-F	- 108 -
4.3.	Modell zur Funktionsweise des E-Proteins von Mini-F	- 112 -
4.4.	Die cop_{ts}-Mutation von Mini-F pJE3022	- 118 -
4.5.	Mini-F Klonierungsvektoren mit modulierbarer Kopiezahl	- 121 -
4.6.	Ausblick	- 123 -
5.	Zusammenfassung	- 125 -
6.	Literaturverzeichnis	

1. Einleitung

1.1. Plasmide-Definition und Verwendungsmöglichkeiten

In nahezu allen Bakteriengruppen lassen sich neben der chromosomalen DNA kleinere, doppelsträngige und kovalent geschlossene zirkuläre DNA-Moleküle nachweisen, die als Plasmide bezeichnet werden. Sowohl die Größe als auch die Kopiezahl der Plasmidmoleküle schwankt beträchtlich und zwar in der Größenordnung von etwa 3-250 Kb bzw. von 1-100 Kopien pro Zelle, wobei kleine Plasmide bis auf wenige Ausnahmen in höherer Kopiezahl vorhanden sind.
Die Plasmid-DNA kodiert für keine essentiellen Funktionen und ist unter diesem Aspekt für die Bakterienzelle entbehrlich. Jedoch können Plasmide dem Bakterienwirt aufgrund ihrer besonderen genetischen Eigenschaften einen Selektionsvorteil gegenüber anderen konkurrierenden Bakteriengruppen verschaffen. Betrachtet man die Vielfalt der Plasmid-kodierten Funktionen, wie zB. a) den DNA Transfer b) Produktion von Enterotoxinen c) Ab- und Umbau komplexer Kohlenstoffquellen d) Abbau giftiger Schwermetalle e) Antibiotikaproduktion f) Restriktion und Modifikation von DNA - so wird das zunehmende Interesse, das in zahlreichen Bereichen der Mikrobiologie an bakteriellen Plasmiden und ihren Funktionen geweckt wurde, verständlich.

Ein weiterer Gesichtspunkt, unter dem Plasmide erforscht und manipuliert werden, betrifft ihre Verwendungsmöglichkeit als Klonierungsvektoren für die Insertion, Vermehrung und Expression von Fremdgenen. Die wesentliche Voraussetzung hierfür war durch die Entwicklung von Verfahren zur

in vitro Neukombination von DNA-Molekülen und zur Einschleusung von DNA in Bakterienzellen geschaffen worden (s. hierzu Übersichtsartikel von Collins, 1977 und Timmis et al., 1977). Unter dem Aspekt, möglichst große DNA-Mengen isolieren zu können und die Expressionsrate von klonierten Genen zu steigern, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Plasmidvektoren konstruiert, die von Plasmiden mit einer hohen Kopiezahl (z.B. ColE1) abstammen. Welchen experimentellen Nutzen Klonierungsvektoren haben können, die sich von einem Plasmid mit niedriger Kopiezahl, wie dem F-Faktor von E. coli ableiten, soll nachfolgend erläutert werden (s. 1.8.).

Neben der Verwendung in vorwiegend anwendungsorientierten Bereichen konnten eine ganze Reihe von Plasmiden in der Grundlagenforschung als geeignete Modellsysteme zur Untersuchung der Replikationsmechanismen von Prokaryonten-DNA dienen. Hierfür waren folgende Gründe wesentlich:

1) Die Plasmid-Replikation ist in hohem Maße von chromosomal -kodierten Funktionen abhängig 2) Plasmide sind für die Wirtszelle entbehrlich und können aufgrund ihrer Größe wesentlich leichter isoliert und genetisch manipuliert werden als das Wirts-Chromosom 3) Die für die Replikation und stabile Vererbung erforderlichen Funktionen auch großer Plasmide sind gewöhnlich innerhalb einer eng begrenzten Region in Umgebung der Startregion der Replikation lokalisiert.

Eine Reduzierung der Plasmid-Moleküle auf eben diese essentiellen Genomabschnitte nach einer Fragmentierung durch Restriktionsendonukleasen erleichterte nachfolgende Untersuchungen wesentlich. So konnte im Falle des F-Faktors von Escherichia coli ein auf 10% der ursprünglichen Molekülgröße

reduziertes Mini-F Plasmid isoliert werden, welches die gleichen Replikationseigenschaften besitzt wie das Elter-Plasmid. Die wesentlichen Merkmale des F-Faktors werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

1.2. Der F-Faktor

Der F-Faktor von Escherichia coli hat ein Molekulargewicht von 62.6×10^6 Dalton, was einer Moleküllänge von etwa 94500 Basenpaaren entspricht (Jakob et al., 1963; Sharp et al., 1972). In der Bakterienzelle kann sich der F-Faktor in zwei alternativen Zustandsformen replizieren, entweder als autonomes DNA-Molekül (F^+- Stämme) oder nach Insertion und zusammen mit dem E. coli Chromosom (Hfr-Stämme). Obwohl dieses Plasmid im autonomen Zustand nur mit 1-2 Kopien in seiner Wirtszelle enthalten ist (Frame und Bishop, 1971), wird es bei jeder Zellteilung stabil weitervererbt, so daß nur äußerst selten plasmidfreie Zellen auftreten.

Das Genom des F-Faktors läßt sich in drei funktionelle Abschnitte gliedern (s. Abb. 1):
Die DNA-Insertionssequenzen, die tra-Gene und die Genloci für vegetative Replikation und Inkompatibilität.
Die Insertionssequenzen IS3, γ-δ und IS2 kartieren im Genom zwischen den Koordinaten 93-20 F (Davidson et al., 1975; Hu et al., 1975). Entsprechende homologe DNA-Sequenzen im E. coli Chromosom ermöglichen dem F-Faktor mittels Rekombination eine Insertion in das Wirtschromosom.
Die Insertion des F-Faktors in das Wirtschromosom ist reversibel. Bei der Exzision können gelegentlich dem F-Faktor

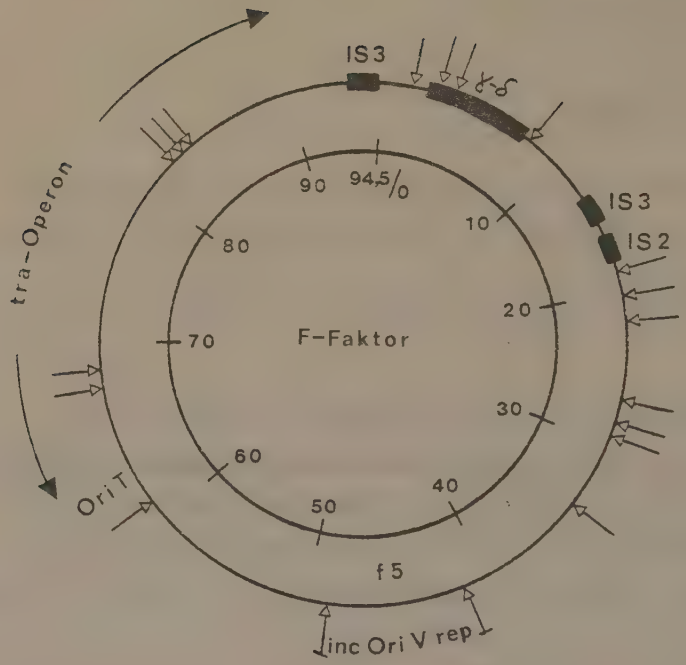


Abb.1: Physikalische und genetische Karte des F-Faktors mit den F-Koordinaten in Kb (innerer Ring). Bedeutung der Symbole: IS2, IS3 und γ-δ = Insertionssequenzen von F; tra-Operon = Gen-Loci für den DNA-Transfer; OriT = Startpunkt für die Transfer-Replikation; OriV = Startpunkt der vegetativen Replikation; inc = Inkompatibilität; rep = Replikationsfunktionen von F. Die äußeren Pfeile markieren die Schnittstellen der Restriktionsendonuklease EcoRI, das EcoRI-Spaltfragment f5 (=Mini-F) ist gekennzeichnet.

benachbarte chromosomale DNA-Regionen in das F-Genom inkorporiert werden. Diese F-Derivate mit chromosomalen Genen werden als F'-Faktoren,wie z.B. F'lac oder F'gal, bezeichnet.

Da der F-Faktor zu den DNA-Transfer-Faktoren gehört, sind Escherichia coli Hfr-Stämme dazu befähigt, mit Hilfe der Transfer Funktionen des F-Faktors ihr Chromosom oder Teile davon in eine F⁻-Rezipientenzelle zu übertragen. Dieser Vorgang wird als bakterielle Konjugation bezeichnet. Die hierfür benötigten tra-Gene und der Startpunkt der Transfer-Replikation (oriT) konnten einem DNA-Bereich von etwa 30 Kb zwischen den Koordinaten 60-90F zugeordnet werden.
Da die Transfer-Replikation des F-Faktors nach einem "Rolling circle" Mechanismus abläuft (Gilbert und Dressler, 1968) und völlig anderen Kontrollmechanismen unterliegt als die vegetative Replikation, soll sie hier nicht weiter behandelt werden. Siehe hierzu Übersichtsartikel von Clark und Warren (1979) und Willets und Skurray (1980).
In unmittelbarer Nähe der Startstelle für die vegetative Replikation (oriV) zwischen den Koordinaten 42.9-52.2 F konnten die Funktionen lokalisiert werden, die für die vegetative Replikation (rep) und Verteilung des F-Faktors während einer Zellteilung erforderlich zu sein scheinen (Davidson et al., 1975; Skurray et al., 1978). In dieser Region kartieren auch die Inkompatibilitätsfunktionen (inc), die eine Koexistenz von zwei oder mehreren F-Faktoren in einer Zelle verhindern. Das Phänomen der Inkompatibilität bei Plasmiden wird nachfolgend noch erörtet werden.
Da die Plasmidreplikation in dieser Arbeit von wesentlichem Interesse ist, sollen im Folgenden die allgemein gültigen

Charakteristika dieses Vorganges erläutert und am Beispiel des F-Faktors konkretisiert werden.

1.3. Die Replikation von Plasmid-DNA

Die vegetative Replikation von Plasmid-DNA läßt sich ebenso wie die eines bakteriellen Chromosoms in drei Phasen unterteilen: Die Initiation am Startpunkt der Replikation (oriV), die Strangverlängerung durch DNA-Synthese in 5'→3' Richtung und die Termination nach Ablauf eines Replikationszyklus.
Nach der Initiation verläuft die Replikation von Plasmiden nach der von Cairns et al., (1963) für zirkuläre DNA-Moleküle beschriebenen Theta-(Θ) Form. Die Replikationsrichtung ist jedoch Plasmid-spezifisch. Sie kann unidirektional sein, wie z.B. bei den Plasmiden ColE1 (Lovett et al., 1974) und RK2 (Meyer und Helinski, 1977) oder bidirektional, wie z.B. bei den Plasmiden R6K (Lovett et al., 1975) oder dem Mini-F Plasmid pML31 (Eichenlaub et al., 1977).
Bei der unidirektionalen Replikationsform ist der Startpunkt der Replikation auch gleichzeitig der Terminationsort. Bei der bidirektionalen Replikation erfolgt die Termination am Treffpunkt der beiden Replikationsgabeln.

Sowohl für die Initiation der Replikation, als auch für die nachfolgende DNA-Synthese benötigen Plasmide zahlreiche Wirtsfunktionen, die auch für die chromosomale Replikation erforderlich sind (siehe Staudenbauer, 1978 und Kolter und Helinski, 1979).
So konnte für den F-Faktor eine Abhängigkeit von den Produkten des dnaB und dnaC Gens nachgewiesen werden (Goebel und Schrempf, 1972; Van Brunt et al., 1977). Es besteht jedoch keine

Abhängigkeit von dem dnaA-Protein, welches eine Initiatorfunktion für die chromosomale Replikation haben soll (Messer et al., 1975; Zahn und Messer, 1979). Aus diesem Grund erklärt sich auch die Fähigkeit einer temperatursensitiven E. coli dnaA Mutante, in deren Chromosom ein F-Faktor integriert ist, bei einer nicht permissiven Temperatur (42°C), die Replikation am Origin des integrierten F-Faktors zu initiieren (Nishimura et al., 1971). Dieser Vorgang wird als "Integrative Suppression" bezeichnet.
Von den drei E. coli DNA-Polymerasen scheint der F-Faktor nur die vom dnaE-Gen kodierte DNA-Polymerase III zu benötigen (Thompson und Broda, 1973). Eine Abhängigkeit von den DNA -Polymerasen I und II (polA und polB) konnte nicht festgestellt werden (Hirota et al., 1972).

Da die Initiation der F-Replikation durch den RNA-Synthese Inhibitor Rifampicin blockiert werden kann (Kline, 1973), wird postuliert, daß an diesem Ereignis neben verschiedenen Proteinkomponenten auch eine nicht translatierte RNA, der sogenannte RNA-Primer, beteiligt ist. Der RNA-Primer, welcher kurz vor einem Initiationsereignis von der RNA-Polymerase synthetisiert wird, hybridisiert mit einem der beiden DNA-Stränge der sich bildenden Replikationsschlaufe. Das als "Origin" definierte 3'OH-Ende der Primer-DNA dient der DNA-Polymerase III dann als Startpunkt der DNA-Synthese in 5'→ 3'Richtung.
Für das Escherichia coli Chromosom (Messer et al.,1975) und das Plasmid ColE1 (Itoh und Tomizawa, 1980) konnten solche nicht translatierten RNA-Primer inzwischen nachgewiesen werden.

Die Isolation von konditionalen Plasmidmutanten hat gezeigt,

daß neben Wirtsfunktionen auch Plasmid-eigene Funktionen an der Replikation dieser DNA-Elemente beteiligt sein müssen. Vermutlich wirken diese Funktionen im Fall des F-Faktors und wahrscheinlich auch bei anderen Plasmiden auf der Initiationsebene der Replikation. Unterstützt wird diese Annahme u.a. durch die Beobachtung, daß sich der F-Faktor pro Zellgeneration (ca. 30 min) nur etwa einmal repliziert, obwohl die dafür benötigte Zeit von ca. 4 min (Gustafsson et al., 1978) mehrere Replikationsrunden in einem Zellzyklus gestatten würde.
Für den Kontrollmechanismus der Plasmidreplikation wurden zwei konträre Modelle formuliert, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

1.4. Regulationsmodelle für die Plasmid-Replikation

Das auf die F-Replikation bezogene Modell von Jacob et al., (1963) postuliert ein positiv wirkendes Kontrollelement, einen Plasmid-kodierten Initiator. Dieser Initiator, der seine Syntheserate möglicherweise autoreguliert (Sompayrac und Maaløe, 1973), bewirkt durch Interaktion mit einem Operator -Gen, dem Replikator, die Initiation der Replikation.

Weil sich vom F-Faktor konditionale Replikationsmutanten isolieren lassen, deren Replikation bei 42°C blockiert ist (Cuzin und Jacob, 1967; Berquist et al., 1980), läßt sich postulieren, daß bei diesen Mutanten ein Plasmid-kodiertes Initiator-Protein zur Thermosensitivität mutiert ist. Eindeutig als Initiatorprotein identifiziert werden konnte bisher nur das π-Protein vom Plasmid R6K, welches als positiv

wirkendes Kontrollelement der Replikation wirkt (Kolter et al., 1978; Inuzuka und Helinski, 1978), und zwar durch Interaktion mit einer spezifischen Plasmid-Sequenz (Germino und Bastia, 1983).
Das zweite Modell von Prichard et al., (1969) postuliert ein frei diffusibles negatives Kontrollelement, einen Plasmid-kodierten Repressor, der die Initiation der Plasmid-Replikation verhindert. Dieser Repressor soll unmittelbar nach der Initiation eines Replikationszyklus in großen Mengen ausgeschüttet werden und sowohl seine eigene Synthese als auch weitere Initiationsereignisse blockieren. Erst, nachdem die intrazelluläre Repressorkonzentration mit zunehmenden Volumen der Bakterienzelle unter einen bestimmten Grenzwert gesunken ist, kann kurz vor der nächsten Zellteilung eine neue Replikationsrunde initiiert werden und damit gleichzeitig eine erneute Synthese des Repressors erfolgen.

Das Inhibitor-Verdünnungs-Modell von Prichard et al., (1969) ist auf den F-Faktor nur teilweise anwendbar.
So ist ein wesentlicher Teilaspekt dieses Modells, nämlich die Initiation der Plasmid-Replikation nach Abnahme der Repressor-Konzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus, für F-Replikation nicht erfüllt. Der F-Faktor kann zu jedem Zeitpunkt während eines Zellzyklus replizieren (Prichard et al., 1975; Andresdottier und Masters, 1978). Hingegen scheinen mutierte Mini-Derivate von F mit erhöhter Kopiezahl (Manis und Kline, 1978) für eine Initiationskontrolle durch einen Plasmid-kodierten Repressor zu sprechen, welcher bei den Kopiezahlmutanten defekt sein könnte.
Im Falle der Antibiotikaresistenz-Faktoren R1drd19 (Molin et al., 1981; Burger et al., 1981) und R6-5 (Danbara et al., 1981)

konnte anhand von Kopiezahlmutanten gezeigt werden, daß die Replikation beider Plasmide durch negativ wirkende Kontrollelemente reguliert zu sein scheint.

Da bei verschiedenen Plasmiden sowohl negativ als auch positiv wirkende Funktionen der Replikationskontrolle nachgewiesen werden konnten, erhalten derzeit beide vorgestellten Modelle experimentelle Unterstützung. Wahrscheinlich existiert beim F-Faktor und anderen Plasmiden mit niedriger Kopiezahl ein komplexes Regulationssystem, welches sowohl positiv als auch negativ wirkende Kontrollelemente beinhaltet.

1.5. Verteilungsmechanismen bei Plasmiden

Die Tatsache, daß Plasmide mit einer niedrigen Kopiezahl ebenso stabil in einer wachsenden Zellkultur weitervererbt werden, wie Plasmide mit hoher Kopiezahl wirft die Frage auf, in welcher Weise die gesicherte Verteilung der Tochtermoleküle eines Plasmids auf die nächste Zellgeneration gewährleistet wird.

Im Falle von Plasmiden mit hoher Kopiezahl wird vermutet, daß die Verteilung der Tochtermoleküle auf die Tochterzellen eines Bakteriums nicht organisiert wird, sondern rein statistisch mit dem Zellplasma erfolgt (Novick et al., 1975). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß auch für Plasmide mit hoher Kopiezahl Mechanismen existieren, die zumindest die gesicherte Verteilung eines Teils der Tochtermoleküle auf die nächste Zellgeneration gewährleisten.
Plasmide mit 1-2 Kopien pro Chromosomenäquivalent, wie der

F-Faktor, benötigen jedoch spezielle Verteilungsmechanismen, um nach ihrer Replikation gleichmäßig auf die Tochterzellen eines Bakteriums verteilt werden zu können.
Die Beteiligung Plasmid-eigener Funktionen an diesen Verteilungsmechanismen konnte experimentell mit der Isolation von entsprechenden Defektmutanten der Plasmide R1 (Nordström et al., 1980), NR1 (Miki et al., 1980) und auch Mini-F (Lane, 1981) nachgewiesen werden.
Mit welchen zellulären Komponenten Plasmid-Funktionen interagieren, damit die Tochtermoleküle eines Plasmids gesichert verteilt werden können, ist gegenwärtig noch umstritten. Jacob et al., (1963) postulieren in ihrem Replikon-Modell spezifische Membranstellen, an die Plasmide für die Initiation der Replikation binden müssen. Durch Verdoppelung dieser Bindestellen und einem Auseinanderweichen während des Zellwachstums werden die Tochtermoleküle eines Plasmids auf die Bakterienhälften verteilt. Durch Septumbildung zwischen den beiden Membranbindestellen bei der Zellteilung erhält jede Tochterzelle eine Plasmidkopie.
Ob tatsächlich spezifische Membranbindestellen für Plasmide existieren, die eine Verteilungsfunktion haben, ist noch ungeklärt. Es gibt jedoch Untersuchungen, die Interaktionen von replizierender DNA des Plasmids ColE1 mit der Membran zeigen (Sherratt und Helinski, 1973; Sparks und Helinski, 1979).

Für den F-Faktor wird neben der Zellmembran das E. coli Chromosom als mögliche Anheftungsstelle favorisiert (Miller et al., 1978; Miller und Kline, 1979). Eine symmetrische Aufteilung der Plasmid-Kopien würde dann durch Kosegregation mit den Chromosom-Duplikaten in die Tochterzellen gewährleistet.

1.6. Inkompatibilität bei Plasmiden

Zwei nahverwandte Plasmide sind gewöhnlich nicht in der Lage, ohne äußeren Selektionsdruck, stabil nebeneinander in einer Zelle zu existieren. Es tritt ein instabiler Zustand ein, der im Laufe der nächsten Zellgenerationen zu einer Aufteilung (Segregation) beider Plasmide in verschiedene Zellen führt. Dieses Phänomen wird als Inkompatibilität bezeichnet und ist eine Funktion der Replikationskontrolle und des Verteilungsmechanismus von Plasmiden.
Unterstützt wird diese Annahme sowohl durch die Beobachtung, daß die Gene für Replikation, Verteilung und Inkompatibilität auf Plasmid-Genomen in unmittelbarer Nachbarschaft kartieren - bei dem F-Faktor innerhalb einer Region von 9 Kb (s. Abb.1) - als auch durch die Tatsache, daß es bisher nicht gelungen ist, autonom replizierende Plasmidmutanten zu isolieren bei denen alle Inkompatibilitätsfunktionen defekt sind (inc$^-$).

Inkompatibilität gilt als ein Indiz für den Verwandtschaftsgrad von Plasmiden. Plasmide, die miteinander inkompatibel sind, werden in die gleiche Inkompatibilitätsgruppe eingeordnet. Gegenwärtig unterscheidet man bei Gram-negativen Bakterien etwa 30 derartige Inkompatibilitätsgruppen. Der F-Faktor gehört zusammen mit 20 anderen Plasmiden zu der Inkompatibilitätsgruppe FI (Datta, 1979).
Experimentell läßt sich die Inkompatibilität zweier Plasmide anhand von Segregationskinetiken nachweisen. Auf solchen Untersuchungen basierend wurden mehrere Modellvorstellungen entwickelt, die aber alle die Inkompatibilität als eine Auswirkung der Replikationskontrolle und der Verteilung von Plasmiden beschreiben.

Während nach dem Modell von Jacob et al., (1963) die Konkurrenz zweier nahverwandter Plasmide um die gleiche Membranbindestelle als Ursache für die Inkompatibilität angeführt wird (kompatible Plasmide benutzen unterschiedliche Bindestellen), beruht das Phänomen der Inkompatibilität nach der Auffassung von Pritchard et al., (1969) auf der Inhibitorwirkung kreuzreagierender Repressormoleküle, die von Plasmiden der gleichen Inkompatibilitätsgruppe kodiert werden.
Modellvorstellungen jüngeren Datums betrachten das Phänomen der Inkompatibilität als ein rein statistisches Problem (Novick und Hoppensteadt, 1978; Cullum und Broda, 1979). Danach bilden zwei inkompatible Plasmide einen intrazellulären Plasmid-"Pool". Die Maximalzahl der Moleküle im "Pool" wird durch die genetisch determinierte Kopiezahl der beiden Plasmide bestimmt (etwa 2 Kopien bei dem F-Faktor).
Wenn nun Plasmide der gleichen Inkompatibilitätsgruppe während einer Zellteilung nach statistischen Regeln auf die Tochterzellen eines Bakteriums verteilt werden, so können Ungleichverteilungen entstehen, die nach mehreren Zellgenerationen zunehmen. Das Ergebnis ist die Auftrennung (Segregation) beider Plasmid-Spezies auf verschiedene Bakterienwirte.

1.7. Das Plasmid Mini-F

Wie schon oben erwähnt, konnten durch vergleichende Heteroduplexanalysen mit Deletionsderivaten von F die für die Replikation und Verteilung des F-Faktors essentiellen Gene einem DNA-Abschnitt zwischen den Koordinaten 42.9-52.2 F zugeordnet werden (Davidson et al., 1975).
Ein völlig neuer Weg in der weiteren Erforschung der

Replikationsfunktionen des F-Faktors eröffnete sich durch die Anwendung von Techniken zur *in vitro* Neukombination von DNA-Molekülen, die Anfang der 70er Jahre entwickelt wurden. So gelang es zwei Arbeitsgruppen, ein von der Restriktionsendonuklease *Eco*RI nach Hydrolyse von F'*lac* DNA erzeugtes Fragment (*Eco*RI-Fragment f5: 40.3-49.3 F; s. Abb.1) *in vitro* mit einem zweiten *Eco*RI-Fragment, welches einen selektiven Marker trug, zu fusionieren und diese DNA-Moleküle in *Escherichia coli* Zellen mittels Transformation einzuschleusen (Timmis et al., 1975; Lovett und Helinski, 1976).
Die beiden unabhängig voneinander konstruierten Mini-F Plasmide mit der Bezeichnung pSC138 (Mini-F'Ap) und pML31 (Mini-F'Km) besitzen alle typischen Charakteristika der F-Replikation. Ihre Kopiezahl ist auf 1-2 Moleküle pro Zelle beschränkt. Die Plasmide werden stabil verteilt und gehören der Inkompatibilitätsgruppe FI an.
Die erfolgreiche Konstruktion einer ganzen Reihe von Mini-Derivaten großer, komplexer Plasmide, wie z.B. von R6-5 (Timmis et al., 1975), R1drd-19 (Kollek et al., 1978) und R6K (Kolter und Helinski, 1978), zeigt, daß Mini-F kein Sonderfall in der Plasmidforschung darstellt.

A) Startpunkte der Replikation

Durch die Vermessung replikativer Zwischenstufen von Mini-F Plasmiden konnten in dem Genom zwei Replikationsstartpunkte kartiert werden (s. Abb.2), die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit Origin I (42.6 F) und Origin II (45.1 F) bezeichnet wurden (Eichenlaub et al., 1977; Eichenlaub et al., 1981).
Die Replikation verläuft vom Origin I aus vorrangig

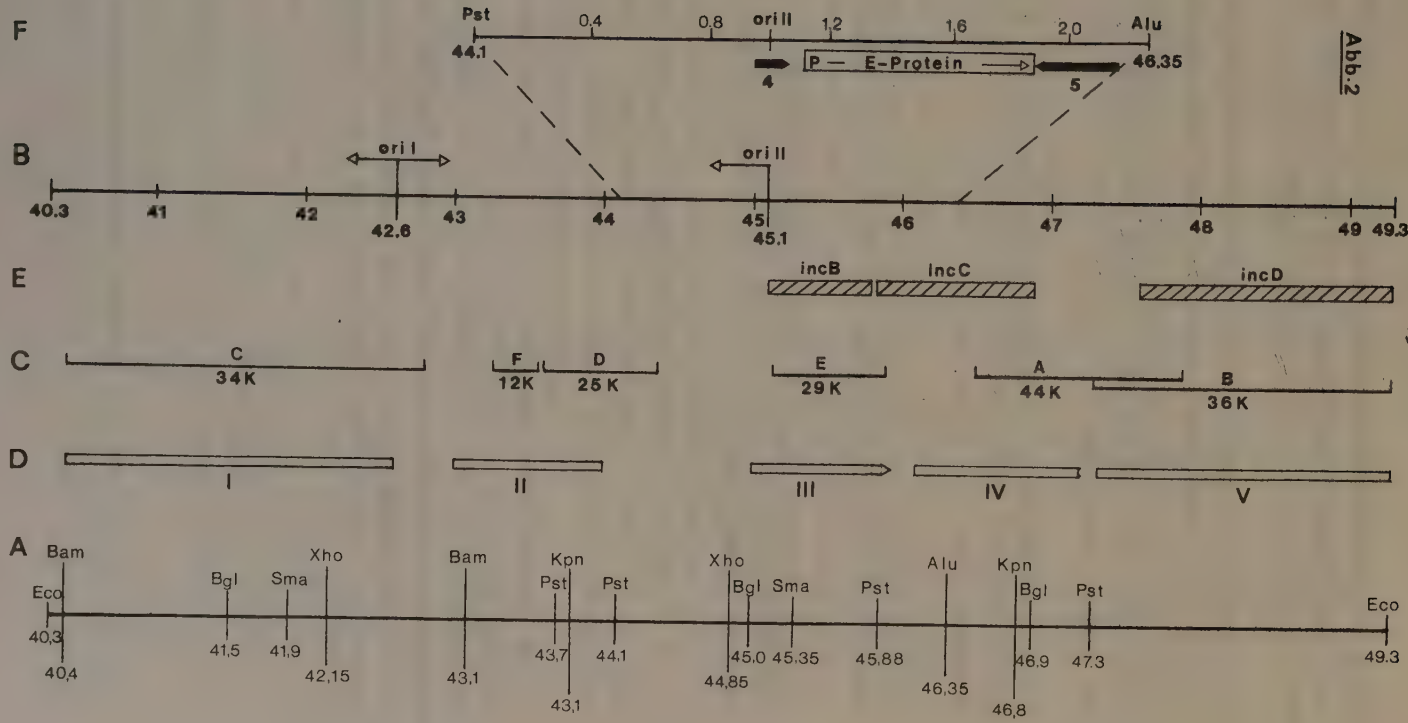

F
Pst
0,4
0,8
ori II
1,2
1,6
2,0
Alu
44,1
P — E-Protein
46,35
4
5
B
ori I
ori II
40,3
41
42
42,6
43
44
45
45,1
46
47
48
49
49,3
E
incB
IncC
incD
C
34K
F
12K
D
25 K
E
29 K
A
44K
B
36K
D
I
II
III
IV
V
A
Bam
Eco
40,3
40,4
Bgl
41,5
Sma
41,9
Xho
42,15
Bam
43,1
Kpn
Pst
43,7
43,1
Pst
44,1
Xho
Bgl
45,0
Sma
45,35
44,85
Pst
45,88
Alu
46,35
Kpn
Bgl
46,9
46,8
Pst
47,3
Eco
49,3

Abb.2

Abb.2: Physikalische und genetische Karte des Plasmids Mini-F. Das Plasmid Mini-F entspricht der DNA des F-Faktors zwischen den F-Koordinaten 40.3-49.3 (EcoRI-Fragment f5).

A) Restriktionskarte von Mini-F: Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind mit den F-Koordinaten in Kilobasen (Kb) angegeben. Abkürzungen für die Schnittstellen: Alu = AluI, Bam = BamHI, Bgl = BglII, Eco = EcoRI, Kpn = KpnI, Pst = PstI, Sma = SmaI, Xho = XhoI.

B) Die Startpunkte der vegetativen Replikation: ori I (42.6 F), ori II (45.1 F). Die Replikationsrichtung ist durch Pfeile markiert.

C) Die Kodierungsregionen der sechs Mini-F Proteine mit den zugehörigen Molekulargewichten der Proteine in Kilodalton (K).

D) Die Positionen der fünf Transkripte von Mini-F. Die Transkriptionsrichtung des Transkripts III ist durch die Pfeilrichtung gekennzeichnet.

E) Die Inkompatibilitäts-Loci von Mini-F: Die drei Inc-Loci incB (45.1-45.8 F), incC (45.8-46.9 F) und incD (47.6-49.3 F) sind durch schraffierte Rechtecke gekennzeichnet.

F) Das Basisreplikon von Mini-F (2.25 Kb) mit den begrenzenden PstI (44.1 F) und AluI (46.35 F) Schnittsequenzen. Die Kodierungsregion des E-Proteins, die Lage des Promoters und die Transkriptionsrichtung ist eingerahmt. Die Lage und relative Orientierung der 4 und 5 19 bp langen repetitiven DNA-Sequenzen, die das E-Gen flankieren, ist durch dicke Pfeile markiert.

bidirektional und vom Origin II aus unidirektional (in Richtung auf das 40.3 Kb Ende von Mini-F). Das intakte Mini-F Plasmid pML31 scheint seine Replikation ausschließlich am Origin I zu initiieren. Der Origin II wurde erst entdeckt, als es Manis und Kline (1977) gelang, ein Mini-F Derivat zu isolieren, das alle Mini-F spezifischen Replikations- und Stabilitätseigenschaften hat, dem aber das BamHI-Fragment (40.4-43.1 F) mit dem Origin I fehlt.
Warum der Origin II in einem intakten Mini-F Replikon nicht benutzt wird, ist gegenwärtig noch ungeklärt. Möglicherweise dominiert das Initiationssystem am Origin I über das System am Origin II, so daß diese Startstelle nur aktiviert werden kann, wenn der Origin I fehlt oder mutagen verändert wird.
Es ist jedoch auch denkbar, daß beide Startstellen alternativ benutzt werden, wobei dies von dem jeweiligen Bakterienwirt und dessen physiologischen Zustand abhängig sein könnte (Eichenlaub, pers. Mitteilung).

B) Transkripte und Proteine von Mini-F

Zur Identifizierung der von Mini-F kodierten Polypeptide wurde sowohl das ganze Genom als auch durch verschiedene Restriktionsendonukleasen erzeugte Spaltprodukte von Mini-F in die Klonierungsvektoren pBR322 (Bolivar et al., 1977) oder λdv1 (Matsubara, 1976)integriert und die von den Rekombinanten *in vivo* expremierten Proteine im *Escherichia coli* Minizellensystem (Frazer und Curtiss, 1975) analysiert (Wehlmann und Eichenlaub, 1980; Komai et al., 1982).
Bisher konnten sechs Mini-F Proteine mit den Molekulargewichten 44.000 (A); 36.000 (B); 34.000 (C); 29.000 (E); 25.300 (D);

und 12.000 (F) Dalton identifiziert werden.
Die Einführung von Deletionen in das Genom, bzw. eine vergleichende Analyse der klonierten Mini-F Fragmente ermöglichte eine Zuordnung zu bestimmten DNA-Regionen, in denen die sechs Polypeptide kodiert werden (s. Abb.2).
Zur Bestätigung und Überprüfung der Proteindaten wurden in vitro sogenannte R-Loop Analysen mit gereinigter Mini-F DNA durchgeführt (Wehlmann und Eichenlaub, 1981).
Es konnten fünf verschiedene Transkripte von Mini-F identifiziert und kartiert werden, (s. Abb.2) die sich den Gen-Loci für die Mini-F Proteine A, B, C, D und E zuordnen lassen (Wehlmann und Eichenlaub, 1980). Die Transkriptionsrichtung der identifizierten Mini-F Transkripte ist anhand widersprüchlicher Versuchsergebnisse von Komai et al., (1982) noch umstritten und konnte bisher nur für das Transkript des E-Proteins eindeutig bestimmt werden (Murotsu et al., 1981).

C) Deletionsderivate von Mini-F

Zur Beantwortung der Frage, welche der von Mini-F kodierten Transkripte bzw. Proteine neben der strukturell benötigten DNA-Region in Umgebung der Replikationsstartpunkte für die Erhaltung von Mini-F essentiell sind, wurde das Genom durch die Einführung von Deletionen mittels Restriktionsendonukleasen systematisch verkleinert. Die erhaltenen Fragmente bzw. Deletionsderivate wurden anschließend auf ihre autonome oder komplementierbare Replikationsfähigkeit hin untersucht (Kahn et al., 1979; Kline und Palchaudhuri, 1980; Ebbers und Eichenlaub, 1981).
Es zeigte sich, daß das kleinste Mini-F Derivat, welches noch

autonom in einer Zelle replizieren kann, ein 2,25 Kb großes DNA-Fragment ist, welches von den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen PstI (44.1 F) und AluI(46.35 F) begrenzt wird (s. Abb.2).
Dieses Basis-Replikon, dessen DNA-Sequenz seit 1981 bekannt ist (Murotsu et al., 1981), enthält den Origin II, das Strukturgen des E-Proteins, kodiert für das Transkript III und besitzt als auffallendstes Merkmal zwei DNA-Abschnitte mit vier und fünf 19 Nukleotidpaaren langen repetitiven DNA-Sequenzen (Repeats), die das Strukturgen des E-Proteins flankieren. Die Funktion dieser repetitiven Sequenzen wird nachfolgend diskutiert werden.

Komplementationsversuche mit replikationsdefekten Deletionsderivaten von Mini-F ergaben, daß sich das Basisreplikon von Mini-F noch weiter auf ein nur 1140 bp großes DNA-Fragment mit dem Origin II reduzieren läßt (44.21-45.35 F), aber nur in Anwesenheit eines zweiten, separat klonierten 1,4 Kb großen Mini-F Fragments (45.0-46.4 F), welches in trans aktiv ist und das Strukturgen des E-Proteins enthält (Tolun und Helinski, 1982). Dem E-Protein von Mini-F konnte anhand dieser Experimente eine essentielle Replikationsfunktion zugesprochen werden.

Da zahlreiche Deletionsderivate von Mini-F, denen DNA-Abschnitte zwischen 46.35 F und 49.3 F fehlen, segregieren, wurde vermutet, daß die Determinanten für Replikation und Verteilung auf separaten Genomabschnitten von Mini-F lokalisiert sind. Für diese Annahme sprechen neue Versuchsergebnisse, die zeigen, daß die zwischen 46.0 F und 49.3 F transkribierten Mini-F Proteine A und B wahrscheinlich nur eine Verteilungsfunktion haben (Ogura und Hiraga, 1983).

D) Inkompatibilitätsfunktionen von Mini-F

Zur Kartierung der Inkompatibilitätsfunktionen von Mini-F wurden zahlreiche Klonierungsexperimente durchgeführt, bei denen von Restriktionsendonukleasen erzeugte Mini-F Fragmente in andere mit Mini-F kompatible Plasmide integriert wurden. Anschließend wurde getestet, ob die Rekombinanten mit Mini-F oder anderen Plasmiden der FI-Gruppe inkompatibel sind (Manis und Kline, 1978; Kahn et al., 1979).
Es konnten drei separate Inkompatibilitäts-Loci im Genom von Mini-F identifiziert werden, die den Nomenklaturvorschlägen von Kline und Lane (1980) folgend mit incB (45.1-45.8 F), incC (45.8-46.9 F) und incD (47.6-49.3 F) bezeichnet wurden (s. Abb. 2).
Während die Gene incB und incC nur Inkompatibilität gegen andere F-Plasmide erzeugen, bewirkt die incD-Region nur Inkompatibilität gegen andere Vertreter der FI-Gruppe (Kline, 1979; Lane, 1981).
Die molekularen Determinanten des incB und incC Locus waren lange umstritten. Neue Befunde haben ergeben, daß die beiden DNA-Abschnitte mit 19 Nukleotidpaaren langen repetitiven Sequenzen, die das Strukturgen des E-Proteins einrahmen, wahrscheinlich den incB und incC Locus repräsentieren, da diese Sequenzen nach ihrer Integration in verschiedene Klonierungsvektoren, Inkompatibilität gegen F-Plasmide bewirken (Tsutsui et al., 1983; Tolun und Helinski, 1982). Die Funktion dieser repetitiven Sequenzen wird in Kapitel 4 dieser Arbeit diskutiert.
Der incD-Locus von Mini-F scheint auf der Ebene der Plasmid-Verteilung zu wirken und kodiert möglicherweise das in dieser Region (47.6-49.3 F) kartierte B-Protein (Gardner et al., 1982).

E) Replikationsmutanten von Mini-F

Die Mutagenese von DNA-Molekülen ist neben der Isolation und Subklonierung von DNA-Fragmenten eine weitere, häufig angewendete Methode zur Charakterisierung von Plasmid-Funktionen.

Für die Mutagenese von Mini-F wurden sowohl chemische Agenzien, wie Hydroxylamin oder Nitrosoguadinin verwendet (Eichenlaub, 1979; Gardner et al., 1980), als auch die mutagene Wirkung von Insertionen des Transposons Tn3 in das Genom ausgenutzt (Kline und Palchaudhuri, 1980; Bergquist et al., 1981). Die unterschiedlichen Phänotypen der bisher isolierten Mini-F Mutanten erlauben eine Typisierung in a) thermosensitive Mutanten, die nur bei Temperaturen um 25°C normal replizieren und bei 42°C ihre Replikationsfähigkeit verlieren ($\underline{rep}_{ts}$); b) Nonsens-Mutanten, die nur unter supprimierenden Bedingungen in entsprechenden *E. coli* Mutanten replizieren können ($\underline{rep}_{non}$) und c) Mutanten mit einer gegenüber dem Wildtyp erhöhten Kopiezahl (*cop*), als Folge einer gesteigerten Anzahl von Initiationsvorgängen der Replikation während eines Zellzyklus.

Bisher war es noch nicht möglich, die defekten Funktionen thermosensitiver Replikationsmutanten von Mini-F zu identifizieren. Jedoch konnten Gardner et al., (1980) zeigen, daß bei 14 von 18 analysierten Mini-F Mutanten mit einem Rep_{ts}-Phänotyp die Mutation im *KpnI*-Fragment (43.8-46.8 F) kartiert.
Da im Gegensatz zu thermosensitiven Mutationen Nonsens-Mutationen im Strukturgen eines Proteins den Ausfall dieses Proteins in Suppressor-negativen Bakterien bewirken, lassen sich derart mutierte Funktionen durch Proteinanalysen direkt nachweisen.

So ergab die Untersuchung zweier amber-Mutanten des Plasmids pML31, daß ein Ausfall des C-Proteins zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit des intakten Mini-F Replikons führt (Eichenlaub und Wehlmann, 1980).
Das C-Protein von Mini-F scheint jedoch nur für die Initiation der Replikation am Origin I (42.6 F) erforderlich zu sein, da nach einer Deletion des BamHI-Fragments (40.4-43.1 F) mit dem Genlocus des C-Proteins und dem Origin I, eine der beiden amber-Mutanten (pML31am1) die Replikation am Origin II (45.1 F) initiieren konnte. Bei der zweiten amber-Mutante (pML31am3) hingegen blieb nach Deletion des BamHI-Fragments der Mutanten-Phänotyp erhalten (Eichenlaub et al., 1981). Es wurde postuliert, daß für die Initiation der Replikation am Origin II ein anderes Mini-F Protein erforderlich ist, welches ebenfalls mutiert ist. Das defekte Protein konnte jedoch nicht identifiziert werden.

Da die Charakterisierung von Kopiezahlmutanten des Plasmids Mini-F Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, werden die Cop-Funktionen von Mini-F im Folgenden noch ausführlich diskutiert werden.

1.8. Problemstellung

Wie schon zuvor erwähnt, lassen sich Mini-F Mutanten mit Defekten in der Replikationskontrolle nach ihrem Phänotyp unterteilen in Mutanten mit Defekten bei der Initiation der Replikation (Rep-Mutanten) und Mutanten mit einer erhöhten Initiationsrate (Cop-Mutanten). Nachdem in den vergangenen Jahren vorwiegend konditionale Rep-Mutanten von Mini-F charakterisiert wurden (s.o.), sollte im Rahmen dieser Arbeit nun

versucht werden, Funktionen von Mini-F zu identifizieren, welche bezüglich der Kopiezahlkontrolle an der F-Replikation beteiligt sind. Dazu sollten Mini-F Plasmide *in vitro* mutagenisiert und anschließend Kopiezahlmutanten und falls möglich, konditionale Kopiezahlmutanten dieser Plasmide selektioniert werden.

Die Typisierung und Charakterisierung der Kopiezahlmutanten sollte unter einem physiologischen und genetischen Aspekt erfolgen.

Zur physiologischen Charakterisierung sollte die Erhöhung der Kopiezahl einzelner Mutanten gegenüber einem Mini-F Wildtyp Plasmid quantifiziert werden und geprüft werden, ob die Kopiezahlveränderung möglicherweise negative Auswirkungen auf die stabile Erhaltung dieser Mini-F Derivate hat.

Im Rahmen der genetischen Charakterisierung sollte das Inkompatibilitätsverhalten der Kopiezahlmutanten untersucht werden. Ferner sollte anhand von Komplementationsexperimenten mit Kopiezahlmutanten und Mini-F Wildtyp Plasmiden geprüft werden, ob der Kopiezahldefekt in Anwesenheit eines Wildtyp-Genoms komplementiert werden kann bzw., ob mutierte Cop-Funktionen *in trans* oder *in cis* aktiv sind.

Durch *in vitro* Rekombinationsexperimente sollten die mutierten Gen-Loci verschiedener Cop-Mutanten kartiert und die cop-Mutationen durch Sequenzanalysen identifiziert werden. Auf diese Weise sollte festgestellt werden a) welche Gen-Loci von Mini-F für die Kopiezahlregulation erforderlich sind b) ob diese Gene für Proteine kodieren oder als Erkennungssignale für Proteine dienen und c) ob die mutierten Cop-Funktionen möglicherweise auch für die Initiation der Replikation relevant sind.

Da die vorliegende Arbeit nicht nur spezielle Probleme der Grundlagenforschung behandeln, sondern ebenfalls anwendungsorientiert sein sollte, bestand die Absicht, konditionale Kopiezahlmutanten von Mini-F als Ausgangsplasmide für die Konstruktion von Mini-F Klonierungsvektoren zu verwenden. Die wesentlichen Kritierien, die diese Vektoren erfüllen sollten, lassen sich in vier Punkten zusammenfassen:

1) Eine stabile Vererbung in dem E. coli Wirtssystem.

2) Eine möglichst geringe Eigengröße, die die in vitro Rekombinationsfähigkeit mit großen DNA-Fragmenten und die Transformationseffektivität der Hybrid-Moleküle verbessert.

3) Eine hohe aber variable Kopiezahl zur Optimierung der DNA-Ausbeuten und Steigerung des Gen-Dosis Effekts.

4) Den Besitz von zwei oder mehreren selektiven Marker Genen (z.B. Antibiotikaresistenz-Gene), die den phänotypischen Nachweis und ein "Screening" auf Rekombinanten ermöglichen. Innerhalb der Marker Gene sollten sich möglichst viele Einzelschnittstellen von verschiedenen Restriktionsendonukleasen befinden, in die Fremd-DNA integriert werden kann.

Der überwiegende Teil der gegenwärtig im E. coli Wirtssystem benutzten Vektoren leitet sich von Plasmiden ab, die eine hohe Kopiezahl haben und Marker Gene besitzen, auf die leicht selektioniert werden kann; wie z.B. R-Faktoren, die Antibiotikaresistenz-Gene enthalten oder Col-Plasmide, die für Colicine kodieren. Der Klonierungsvektor pBR322 und seine Derivate, die sich alle von dem Plasmid ColE1 ableiten, sind derzeit wohl die bekanntesten E. coli Vektoren (Bolivar et al., 1977; Bolivar, 1978). Der Vorteil dieser Vektoren gegenüber anderen Klonierungsvektoren beruht auf der Eigenschaft, die

intrazelluläre Kopiezahl während einer Behandlung der Zellen mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Chloramphenicol von etwa 40 auf mehrere 100 Kopien pro Zelle erhöhen zu können (Amplifikation).
Die hohe Kopiezahl dieser Vektoren und die damit verbundene hohe Expressionsrate von inserierten Fremdgenen hat sich jedoch in mehreren Fällen als Hindernis für die Klonierbarkeit verschiedener E. coli Gene erwiesen. Beispielsweise war es nicht möglich, das ompA-Gen, welches für ein Membranprotein kodiert, oder das dnaA-Gen (Initiatorprotein der chromosomalen Replikation) in dem Klonierungsvektor pBR322 zu vermehren. Dies gelang erst mit Klonierungsvektoren, die eine niedrige Kopiezahl haben (Beck und Bremer, 1980; Hansen und von Meyenburg, 1979).
Wahrscheinlich lassen sich Gene, die für Proteine kodieren, die in hoher Konzentration für die Zelle letal sind (z.B. Membranproteine oder regulatorische Proteine) nur in Vektoren mit niedriger Kopiezahl vermehren und studieren.

Der F-Faktor von E. coli kann, wie an den F'-Faktoren erkennbar wird (s. 1.2.), als ein natürliches Klonierungssystem für alle chromosomalen Gene aufgefaßt werden. Daher sollten Vektoren, die sich von F bzw. Mini-F Plasmiden ableiten, für die Klonierung und Expression jedes E. coli Gens geeignet sein. Ein deutlicher anwendungsbezogener Nachteil der Mini-F Vektoren ist ihre extrem niedrige Kopiezahl, die die Isolation größerer DNA-Mengen (z.B. für in vitro Rekombinationsexperimente) beträchtlich erschwert. Unter diesem Aspekt sollte im Rahmen dieser Arbeit der Versuch unternommen werden, Mini-F Vektoren zu konstruieren, die von konditionalen Kopiezahlmutanten von

Mini-F abstammen und deren Kopiezahl z.B. über die Inkubationstemperatur moduliert werden kann.
Diese Klonierungsvektoren sollten nicht nur zur Charakterisierung der in der Kopiezahlkontrolle von Mini-F involvierten Funktionen dienen, sondern ebenfalls für die Integration von Genen, deren Expression unter variablen Bedingungen untersucht werden soll, geeignet sein.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt.

2.2. Nährmedien

TBY-Medium

10g Bacto-Trypton
5g Hefe-Extrakt
5g NaCl ad 1000 ml H_2O dest., pH 7,5

M9-Medium

30 mM Na_2HPO_4
25 mM KH_2PO_4
10 mM NaCl
20 mM NH_4Cl
1 mM $MgSO_4$
0,2 % Glucose
0,5 µg/ml Thiamin; auf pH 7,5 einstellen

Supplementiertes M9-Medium (M9s) enthielt zusätzlich 0,4 % Casamino-Acids (Difco)

Selektivmedien

TBY-$Ap_{50/900}$	: 50 bzw. 900 µg/ml Ampicillin
TBY-$Cm_{40/250}$	: 40 bzw. 250 µg/ml Chloramphenicol
TBY-Km_{50}	: 50 µg/ml Kanamycin-Sulfat
TBY-Km_{50}/Pen_{100}	: 50 µg/ml Kanamycin-Sulfat und 100 µg/ml Penicillin-G
TBY-$Pen_{100/200}$	: 100 bzw. 200 µg/ml Penicillin-G
TBY-$TC_{7/18}$	: 7 bzw. 18 µg/ml Tetracycline

Agar-Platten

15g Bacto-Agar (Difco) ad 1000 ml Medium

Weichagar

5g Bacto-Agar ad 1000 ml Medium

Tabelle 1: Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
E. coli K-12 C 600	*thr-1*, *leu-6*, *thi-1*, *supE44*, *lacY1*, *tonA21*	Bachmann, 1972
E. coli K-12 MV12	Δ *trpE5*, *thy*, *recA*	Helinski, 1976
E. coli K-12 RH2358	ara_{am}, $lac125_{am}$, *galE*, $galU_{K2am}$, trp_{am}, tsX_{am}, *suIIIA81* (thermolabile Suppressor-tRNA)	Delcuve et al., 1977
E. coli K-12 JM103	Δ (*lac*, *pro*), *thi*, *strA*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*, *supE*, *F'traD36*, *proAB*, *lacIqZ M13*	
E. coli K-12 W3550	*E. coli* K-12 - Wildtyp	Bachmann, 1972

Die *E. coli* Stämme JM103 mit den Phagenvektoren M13mp8 und M13mp9 wurden von der Firma Bethesda Research Laboratories (USA) bezogen.

Tabelle 2: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Plasmid	Struktur und relevanter Phänotyp	Referenz
pACYC184	Cm^r, Tc^r	Chang und Cohen, 1978
pBR325	Ap^r, Cm^r, Tc^r	Bolivar, 1978
pJE101	pBR322:45.88-47.3 F	Wehlmann und Eichenlaub, 1980
pJE138	Cop-Mutante von pSC138	diese Arbeit
pJE139	Cop_{ts}-Mutante von pSC138	diese Arbeit
pJE201	pBR322:44.1-45.88 F	Wehlmann und
pJE301	pBR322:41.5-46.9 F	Eichenlaub, 1980
pJE253	Cop_{ts}-Mutante von Mini F 44.1-47.3 F; Cm^r, Tc^r	diese Arbeit
pJE254	Derivat von pJE253, Cop^+	diese Arbeit
pJE257	pJE253:Mini-F^+, Cop^+, Tc^r	diese Arbeit
pJE258	pJE253 mit λ-cos Sequenz	diese Arbeit
pJE259	pJE253 mit λ-cos Sequenz	diese Arbeit
pJE274	Derivat von pJE253, Rep_{am}	diese Arbeit
pJE276-1	Cop-Mutante von pJE274	diese Arbeit
pJE401	pBR322:Mini-F, Ap^r, Tc^r	Wehlmann und Eichenlaub, 1980
pJE465	pACYC184:Mini-F, Tc^r	diese Arbeit
pJE3001	44.1-47.3 F, TrpED	Ebbers und Eichenlaub, 1981
pJE3011	44.1-47.3 F, TrpED, Ap^r	diese Arbeit
pJE3021	Cop-Mutante von pJE3011	diese Arbeit
pJE3022	Cop_{ts}-Mutante von pJE3011	diese Arbeit
pJE701	pJE253Δ 2.45-3.9 Kb, 43.1-44.85 F^+ Cop^-, Cm^r	diese Arbeit
pLE702	pJE253Δ 2.45-3.9 Kb, 42.1-43.1 F^+ Cop^-, Cm^r	diese Arbeit
pML31	Mini-F'Km^r	Lovett und Helinski, 1976
pML31am3	Rep_{am}-Mutante von Mini-F	Eichenlaub und Wehlmann, 1980
pSC138	Mini-F'Ap^r	Timmis et al.,1977
pRE502	pJE253:Mini-Fam3Δ 40.4-43.1 F, Cop^+	Eichenlaub, 1982

2.3. Puffer (allgemeiner Art)

TES-Puffer

100 mM Tris-HCl; pH 7,5
50 mM NaCl
5 mM EDTA

RP-Puffer

10 mM Tris-HCl; pH 7,5
5 mM NaCl
o,1 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl; pH 7,5
1 mM EDTA

TBE-Puffer

90 mM Tris-Base
90 mM Borsäure
2,5 mM EDTA

TBE-Puffer für Sequenzgele

50 mM Tris-Base
50 mM Borsäure
1 mM EDTA; pH 8,3

Phosphat-Puffer

7g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
3g KH_2PO_4
4g NaCl
ad 1000 ml Aqua dest.

Puffer für Klonanalyse

Mix I

50 mM Glucose
10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl; pH 7,5
2 µg/ml Lysozym

Mix II

0,2 N NaOH
1 % SDS (in H_2O)

Mix III

100 mM Na-Acetat
50 mM Tris-HCl; pH 7,5

Puffer für Enzymreaktionen

Die Puffer für Restriktionsendonukleasen entsprachen den Vorschriften der Vertriebsfirmen.

Puffer für T4-Polynukleotid-Ligase

67 mM Tris-HCl; pH 7,5
33 mM NaCl
10 mM DTT
1 mM ATP

Puffer für T4-Polynukleotid-Kinase: (x 10)

0,5 M Tris-HCl
0,1 M $MgCl_2$
0,1 M DTT
10 mM Spermidin

Puffer für Nuklease S1

30 mM Natriumacetat; pH 4,5
300 mM NaCl
4 mM $ZnSO_4$

Sonstige Lösungen:

Ethidiumbromid-Lösung

5 mg Ethidiumbromid pro ml H_2O

Szintillations-Mix

1600 ml Toluol
8 g PPO (2,5-Diphenylozazole)
160 g POPOP (1,4-Bis 2-(5-phenyl)-oxazolylbenzol)
900 ml Triton X-100

Isopropanol-CsCl-Lösung

37 g CsCl in 41 ml TES lösen; danach Zugabe von 100 ml Isopropanol.

Farbmarker zur Frontmarkierung:

1 ml TES-Puffer
1 ml Bromphenolblau (1 mg/ml H_2O)
2 ml Gycerin

Farbmarker für Sequenzierungs-Gele

0,2 ml Bromphenolblau (1 mg/ml H_2O)
0,2 ml Xylen-Cyanolblau (1 mg/ml H_2O)
0,8 ml EDTA (250 mM)
8,8 ml 100 % Formamid

Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung

240 ml Chloroform
10 ml Isoamylalkohol

2.4. Enzyme und Chemikalien	Herkunft
Enzyme:	
Restriktionsendonukleasen	Bethesda Research Laboratories Inc. (USA) Biolabs (USA) Boehringer (BRD)
Lysozym	Sigma Chemical Company (USA)
T4-Polynukleotid Kinase	Miles Laboratories (USA)
RNAse A DNA-Polymerase I- Klenow Fragment	Boehringer (BRD)

Die Nuklease S1 wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Prell zur Verfügung gestellt. T4-Polynukleotid-Ligase wurde nach der Methode von Tait et al., (1980) isoliert.

Chemikalien:

Antibiotika: Ampicillin, Chloramphenicol Kanamycin, Penicillin-G, Tetracyclin	Sigma Chemical Company (USA)

Chemikalien:	Herkunft
Agar und Nährmedien	Difco Laboratories (USA)
Isopropanol, Caesiumchlorid	Baker (Niederlande)
Formamid	Fluka (BRD)
Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED, Triton X-100, t-RNA (aus Hefe)	Serva (BRD)
Ethanol, Glycerin	Riedel de Haen (BRD)
ATP	Boehringer (BRD)
Agarose	Bethesda Research Laboratories (USA)
Ethidiumbromid	Sigmal Chemical Company (USA)
Hydroxylamin	Baker (Niederlande)
EcoRI-Linker	Collaborative Research Inc., (USA)
α-(^{32}P) dATP, ^{3}H-Thymidin	Amersham Buchler (Großbritannien)

Reagenzien und Nukleinsäuren für die DNA-Sequenzierung wurden bis auf wenige Ausnahmen von der Firma PL-Biochemicals (USA), bezogen.
Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck AG, Darmstadt, bezogen.

2.5. Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte in Anlehnung an die Methode von Birnboim und Doly (1979).
Im allgemeinen wurden 40 ml TBY- oder M9-Medium (oder ein Mehrfaches dieses Volumens) mit einem plasmidhaltigen Bakterienstamm angeimpft und die Kultur wahlweise bei 25°C, 30°C oder 37°C bis zur stationären Phase (Endtiter etwa 2-3 x 10^9 Zellen/ml) inkubiert.
Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation bei 12.062 x g sedimentiert (Sorvall Rotor SS34, 10 min bei 10.000 Upm, 4°C), in 7 ml Mix I (s. Klonanalyse-Puffer) resuspendiert und während einer 30 min Inkubation bei 0°C sphäroplastiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 14 ml Mix II (s. Klonanalyse-Puffer) und einem sorgfältigen Vermischen der Suspension.
Nach einer 5 min Aufbewahrungszeit in Eis wurde die chromosomale DNA zusammen mit den Zelltrümmern durch Zugabe von 10,5 ml 3M Natriumacetat (pH 4,8) und vorsichtigem Vermischen der Suspension ausgefällt. Nach 1 h bei 0°C wurden die Zelltrümmer mit einem Großteil der chromosomalen DNA sedimentiert (48.000 x g, Sorvall Rotor SS34, 20.000 Upm, 0°C). Das Volumen des Überstandes wurde bestimmt, im Verhältnis 1:1 mit Isopropanol gemischt und das Gemisch 30 min bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch eine 10 min Zentrifugation bei 13.000 x g (Sorvall Rotor HB-4, 9.000 Upm, 10°C) präzipitiert.
Die Plasmid-DNA wurde in 3 ml TE-Puffer aufgenommen und mit 3,6 g Cäsiumchlorid und 0,3 ml Ethidiumbromid-Lösung vermischt. Eventuell ausfallende Zellproteine konnten durch eine

Vorzentrifugation des Ansatzes bei 8.900 x g sedimentiert werden (Sigma Zentrifuge, Typ 2MK, 11.500 upm, 15 min bei 15°C). Die DNA-Lösung wurde auf Ultrazentrifugationsröhrchen (Kontron, 12,7 x 50,8 mm) verteilt und die Dichte der CsCl-Lösung mit TE-Puffer auf 1,55 g/cm^3 eingestellt.
Es folgte (für 6 h) eine Ultrazentrifugation bei 370.000 x g (Rotor, VTi-65, Beckmann Ultrazentrifuge L2-65B 50.000 Upm, 15°C). Sowohl die Plasmid-DNA als auch Reste der chromosomalen DNA waren danach durch interkaliertes Ethidiumbromid im durchscheinenden UV-Licht als zwei getrennte Banden sichtbar. Die dichtere der beiden DNA-Banden entsprach der Plasmid-DNA. Sie wurde mit einer Kanüle abgetropft und gesammelt. Falls es für das folgende Experiment erforderlich war, wurde zur weiteren Reinigung der Plasmid-DNA eine zweite Dichtegradientenzentrifugation unter obigen Bedingungen durchgeführt.
Ansonsten wurde das in die Plasmid-DNA interkalierte Ethidiumbromid durch mehrfaches Vermischen mit Isopropanol (gesättigt in CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,55 g/cm^3) extrahiert und die DNA-Lösung 8-12 h gegen TES-Puffer dialysiert. Nach einer Ethanol-Präzipitation (s. 2.6.) wurde die Plasmid-DNA in 10-50 µl RP-Puffer resuspendiert und bei 5°C im Dunkeln aufbewahrt.
Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (1 OD_{260nm} = 50 µg ds DNA/ml).

2.6. Präzipitation von Nukleinsäuren:

Zur Präzipitation von Nukleinsäuren wurde sowohl Ethanol (absolut) als auch Isopropanol (absolut) verwendet.

Zu der Nukleinsäure-Lösung wurden 0,1 VE 3M-Natriumacetat, pH 7,5 und 2,2 VE Ethanol (oder 1,1 VE Isopropanol) zugesetzt. Der Ansatz wurde vermischt und bei -70°C so lange aufbewahrt, bis das Gemisch viskös wurde. Anschließend wurde die als Natriumsalz ausgefallene Nukleinsäure durch Zentrifugation sedimentiert. Bei großen Volumina erfolgte die Zentrifugation bei 3.000 x g (Sorvall Rotor HB-4, 9000 Upm, 5°C). Kleinere Volumina (bis 1,5 ml) wurden entweder in der Eppendorf- oder in der Sigma-Tischzentrifuge 2MK in Eppendorfreaktionsgefäßen zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die Nukleinsäure im evakuierten Exsikator getrocknet und anschließend in einem geeigneten Puffer resuspendiert.

2.7. In vitro Mutagenese von Plasmid-DNA mit Hydroxylamin

Zur in vitro Mutagenese von DNA wurden jeweils 3-5 µg gereinigte Plasmid-DNA mit Ethanol präzipitiert und in 50 µl 0.1 M Natriumphosphat-Lösung (pH 6,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl 1M Hydroxylamin-Lösung; pH 6.0 (frisch angesetzt) wurden die Ansätze geteilt und 15-60 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze gegen 3 x 0,5 L TES-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse konnte die chemisch modifizierte Plasmid-DNA entweder sofort zur Transformation von E. coli Bakterien weiterverwendet werden, oder sie wurde bis zum späteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

2.8. Hydrolyse (Fragmentierung) von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Reaktionsbedingungen für die Hydrolyse von Plasmid-DNA

entsprachen den Angaben der Vertriebsfirmen. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), New England Biolabs oder Bethesda Research Laboratories (beide USA) bezogen.
Die einzusetzende Menge an Enzymeinheiten berechnete sich nach der zu hydrolysierenden DNA-Menge und der Anzahl von Schnittsequenzen einer Restriktionsendonuklease in der DNA. Alle Inkubationen erfolgten für 1-4 h. Die Reaktionen wurden durch Hitzeinaktivierung der Enzyme (10 min, 70°C) beendet und durch elektrophoretische Auftrennung von DNA-Proben auf Agarose-Gelen (s. 2.10.) kontrolliert.
Sollte eine Hydrolyse durch zwei oder mehrere Restriktionsendonukleasen erfolgen, deren Puffermilieu stark divergierte, so wurde die DNA nach der ersten Verdauung mit Ethanol präzipitiert, in dem nächsten Enzympuffer aufgenommen und von der zweiten Endonuklease hydrolysiert.
Sollte die DNA in weiteren biochemischen Reaktionen modifiziert oder *in vitro* neukombiniert werden, so wurde der Restriktionsansatz zur Abtrennung der Enzymproteine mehrmals mit einem Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1; v/v) extrahiert und erst dann mit Ethanol präzipitiert.

2.9. *In vitro* Neukombination (Ligation) von DNA-Fragmenten

Die von Restriktionsendonukleasen erzeugten und *in vitro* neuzukombinierenden DNA-Fragmente wurden in Ligase-Puffer vereint. Das Volumen der Reaktionsansätze und die eingesetzte Menge an T4-Polynukleotidligase richtete sich nach der Anzahl der Fragmentenden im Ansatz, dem Typ der Fragmentenden (kohäsive oder glatte Enden) und dem gewünschten Reaktionsprodukt

(zirkuläre oder polymere Moleküle).
In der Regel wurden 0,5-2 µg DNA-Fragmente in 40-80 µl Ligase-Puffer vermischt und unter Zugabe von 1-2 Enzymeinheiten T4-Polynukleotidligase bei 15°C Inkubationstemperatur in einem Zeitraum von 6-16 h neukombiniert. Für eine Neukombination von DNA-Fragmenten mit glatten Enden wurde zur Verbesserung der Ligationseffektivität die DNA-Konzentration und Enzymmenge im Ansatz um ein Vielfaches erhöht. Die Reaktionen wurden durch elektrophoretische Auftrennung von DNA-Proben auf Agarose-Gelen kontrolliert und durch Hitzeinaktivierung der T4-Polynukleotidligase (10 min bei 70°C) beendet.

2.10. Agarose-Gelelektrophoresen

Die Auftrennung von Plasmidpräparationen im Rahmen von Klonanalysen zur qualitativen Abschätzung intrazellulärer Plasmidkonzentrationen (Kopiezahlabschätzung) und die Auftrennung von Plasmid-DNA nach ihrem Molekulargewicht für analytische und präparative Zwecke erfolgte mittels vertikaler Agarose-Gelelektrophoresen.
Die Agarose-Plattengele waren 10 cm lang, 15 cm breit und 0,5 cm dick. Für alle Elektrophoresen wurde das Tris-Borat Puffersystem (TBE-Puffer) von Peacock und Dingmann (1968) verwendet. Die Agarose-Konzentration im Gel richtete sich nach den Molekulargewichten der aufzutrennenden DNA-Fragmente und variierte von 0,9 % - 2,4 % (w/v).
Die Elektrophoresen erfolgten bei Raumtemperatur und einer konstanten Stromstärke von 55 mA, wobei die Voltzahl in Abhängigkeit von der Agarose-Konzentration variierte (etwa 100-180 V). Die Kathode befand sich im oberen und die Anode

im unteren Pufferreservoir.
Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in Anwesenheit von 0,2 % SDS für 10 min auf 70°C erhitzt, dann mit einem Gemisch aus Glycerin und Bromphenolblau vermischt (Endkonzentration 10 % bzw. 0,01 %) und vorsichtig in den Geltaschen dem Elektrophorese-Puffer unterschichtet. Die Laufzeit der Elektrophoresen variierte zwischen 2-4 h.
Die DNA-Banden wurden nach der Elektrophorese durch Einfärben mit Ethidiumbromid (ca. 0,5 µg/ml Endkonzentration) im durchscheinenden UV-Licht sichtbar gemacht (Chromato-VUE-Transilluminator; Ultra Violet Products) und mit einer Polaroid MP3-Kamera photographiert.

2.11. Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten

Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophoresen. Die Agarose-Konzentration (0,9 % - 2,4 %) im Gel, sowie die Laufzeit der Elektrophoresen (1 h - 4 h) richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu präparierenden DNA-Fragmente.
Nach der Elektrophorese wurde das Agarose-Gel kurz mit Ethidiumbromid angefärbt, der Gelstreifen mit der gewünschten DNA-Bande im durchscheinbaren UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten und in einen einseitig verschlossenen Dialyseschlauch (ø 2 cm) geschoben.
Nach Zugabe von 0,6-1,2 ml TBE-Puffer und 20 µg t-RNA wurden die im Schlauch verbliebenen Luftblasen entfernt und die Einfüllöffnung des Schlauches verschlossen. Der Gelstreifen wurde parallel zu einer Schlauchwand ausgerichtet und der Dialyseschlauch in einer Flachbett-Elektrophoresekammer quer

zur Stromrichtung so fixiert, daß die Schlauchseite mit dem Gelstreifen der Kathode näher war. Der Dialyseschlauch wurde mit TBE-Puffer überschichtet und die DNA aus dem Gelstreifen elektroeluiert (45 min bei 60 mA/280 V). Durch kurzzeitiges Umpolen (30-60 sec, 60mA/280 V) wurde die DNA von der Schlauchwand, an der sie gebunden hatte, wieder abgelöst.
Die DNA-Lösung wurde zur Reinigung von SDS, Ethidiumbromid und Agarose Partikeln in ein Eppendorfgefäß transferiert, mehrmals mit einem Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1, v/v) extrahiert, zur Volumenverminderung bei -70°C eingefroren und im evakuierten Exsikator eingeengt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und in einem für die weitere Verwendung geeigneten Puffer resuspendiert.

2.12. Behandlung von DNA-Fragmenten mit Nuklease S1

Um die von Restriktionsendonukleasen erzeugten DNA-Fragmente mit kohäsiven Enden in vitro mit DNA-Fragmenten mit glatten Enden oder mit Linker-Oligonukleotiden (s. 2.13.) verbinden zu können, müssen die ungepaarten Einzelstrangenden entweder aufgefüllt oder abverdaut werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einzelstrangenden mit Nuklease S1 abverdaut. Dazu wurde das ausgewählte, von Restriktionsendonukleasen erzeugte DNA-Fragment präparativ isoliert (keine t-RNA Zugabe) und in 50-100 µl Nuklease S1 Puffer resuspendiert (etwa 2 µg DNA pro 50 µl Puffer). Nach Zugabe von 6-12 Enzymeinheiten Nuklease S1 wurde der Ansatz 1 h bei 20°C inkubiert, anschließend mit 1/10 VE Tris-Base und EDTA (250 mM) vermischt und mehrmals mit Chloroform-Isoamylalkohol Lösung extrahiert. Die DNA wurde präzipitiert und in einem für die nachfolgenden

Reaktionen geeigneten Puffer resuspendiert.

2.13. Linkerung von DNA-Fragmenten

Zwei von verschiedenen Restriktionsendonukleasen erzeugte DNA-Fragmente mit nicht komplementären Enden können in vitro neukombiniert werden, indem die Enden eines (oder beider) DNA-Fragmente durch die Ankoppelung von "Linker"-Oligonukleotiden in die benötigten komplementären Enden umgewandelt werden. (Synthetisch erzeugte DNA-Linker können käuflich erworben werden).
Das für die kovalente Anknüpfung der Linker-Oligonukleotide vorgesehene DNA-Fragment wurde nach Hydrolyse von DNA (20-100 µg) mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease präparativ isoliert. Die ungepaarten Einzelstrangenden des präparierten DNA-Fragments wurden mit Nuklease S1 abverdaut (s. 2.12.) und die DNA anschließend mit Ethanol präzipitiert.

Phosphorylierung der Linker

Da die im Fachhandel erhältlichen Linker-Oligonukleotide an den terminalen 5'- Enden keine γ-Phosphatgruppen besitzen, müssen die Linker vor Gebrauch unter Verwendung des Enzyms T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert (aktiviert) werden. Hierzu wurden i.d.R. 5 µg Linker (in 5 µl 6 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM NaCl und 0,1 mM EDTA) mit 2 µl Kinase-Puffer (x 10) vermischt und die Reaktion nach Zugabe von 13 µl H_2O, 2 µl ATP (Endkonzentration 0,6 mM) und 8 Enzymeinheiten T4-Polynukleotid-Kinase (= 8 µl) gestartet. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurde die T4-Polynukleotid-Kinase durch

einen 10 min Hitzeschock bei 70°C inaktiviert und die phosphorylierten Linker bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.
Falls die nachfolgenden Reaktionen kontrollierbar sein sollen, können die Linker auch mit ^{32}P-ATP aktiviert werden.

Kovalente Bindung der Linker an die DNA-Fragmentenden

Zur kovalenten Verbindung der Linker mit dem isolierten DNA-Fragment wurden 1-2 µg DNA mit 0,5 µg phosphorylierten Linkern in einem Gesamtvolumen von 30 µl Ligase-Puffer vermischt. Nach Zugabe von 10 Enzymeinheiten T4-Polynukleotid-Ligase wurde der Ansatz 16 h bei 15°C inkubiert und die Reaktion durch Analyse einer DNA-Probe auf einem Agarose-Gel kontrolliert.
Zur Abtrennung der nicht an die Fragmentenden gebundenen Linker-Mono- und Oligomere wurde das "gelinkerte" DNA-Fragment elektroeluiert.
Anschließend wurden die an das DNA-Fragment gekoppelten Linker durch eine, die Linker-Sequenz erkennende, Restriktionsendonuklease gespalten. Durch Präzipitation der DNA konnten die nicht präzipitierbaren, in der Hydrolyse abgespaltenen, halben Linker-Oligonukleotide abgetrennt werden. Anschließend wurde das gelinkerte DNA-Fragment mit seinen modifizierten DNA-Enden in die komplementäre Schnittsequenz eines Klonierungsvektors einrekombiniert und in Bakterien vermehrt.

2.14. Transformation von E. coli Stämmen

Für die Transformation von E. coli Stämmen wurde die Methode

von Cohen et al., (1972) in leicht modifizierter Form angewendet.

Je 20 ml TBY-Kulturen wurden mit 0,1 ml frischer ÜK des Rezipientenstammes angeimpft und bei 37°C unter Belüftung bis zu einem Zelltiter von 2-3 x 10^8/ml angezüchtet. Die Bakterien wurden in sterilen Zentrifugenröhrchen bei 4.400 x g sedimentiert (Sorvall Rotor SS34, 6000 Upm, 5 min bei 3°C), mit 10 ml NaCl (10 mM) gewaschen, wieder zentrifugiert und in 10 ml $CaCl_2$ (90 mM) resuspendiert.

Nach 15 min Inkubation in Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 2 ml $CaCl_2$ (90 mM) aufgenommen.

Jeder Transformationsansatz bestand aus 200 µl kompetenten Zellen, 0,1 - 2 µg DNA (in wechselnden Volumina) und wurde mit 90 mM $CaCl_2$ auf ein Endvolumen von 300 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde in sterilen Eppendorfgefäßen vermischt und 30-40 min bei 0°C inkubiert.

Nach einem Hitzeschock (3 min bei 42°C) wurde die Bakteriensuspension mit 2,5 ml TBY-Medium vermischt und zur Expression der Plasmid-DNA 90 min lang als Roller-Kultur bei 37°C inkubiert. Zur Selektion auf Transformanten wurde das Transformationsgemisch auf Agarplatten mit entsprechendem Selektivmedium ausgespatelt und bei 37°C bebrütet.

Falls mit Plasmiden bzw. mit Bakterienstämmen gearbeitet wurde, die thermosensitive Mutationen enthielten, wurde für das gesamte Experiment eine Inkubationstemperatur von 25°C gewählt und die Inkubationszeiten verdoppelt.

2.15. Klonanalyse

Die Klonanalyse wurde in modifizierter Form nach einer Vorschrift von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Diese Methode eignet sich nicht nur zum physikalischen Nachweis von neukombinierter Plasmid-DNA und zu einer qualitativen Abschätzung intrazellulärer Plasmidkonzentrationen von Plasmiden mit stark abweichender Kopiezahl, sondern sie kann in standartisierter Form auch für die Kopiezahlbestimmung von *in vivo* radioaktiv markierter Plasmid-DNA verwendet werden (s. 2.16.).

In der Regel wurde die zu analysierende Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen der Wirtsbakterien gewonnen, die je nach der erforderlichen Inkubationstemperatur ausgehend von einem gemeinsamen Starttiter entweder 10 h bei 42°C oder 20 h bei 25°C bis zu einem Endtiter von 2-3 x 10^9 Zellen/ml gewachsen waren. Sollte die intrazelluläre Plasmidkonzentration von Plasmiden miteinander verglichen und die Kopiezahl abgeschätzt werden, so wurde auf eine Übereinstimmung der Endtiter von 25°C- und 42°C-Zellkulturen geachtet.
Jeweils 1 ml der Bakterienkulturen wurde in Eppendorfgefäße überführt, die Zellen wurden pelletiert (3 min Eppendorf-Tischzentrifuge) und sorgfältig in 150 µl Mix I (s. Klonanalyse-Puffer) resuspendiert.
Nach 30 min Inkubation in Eis wurden die sphäroplastierten Zellen mit 300 µl alkalischer SDS-Lösung (Mix II) vermischt. Die Suspension wurde 5 min bei 0°C inkubiert, 225 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,8) hinzugegeben und erneut vorsichtig vermischt. Während der folgenden 1 h Aufbewahrungszeit in Eis

präzipitieren ein Großteil der Proteine, der hochmolekularen RNA und der chromosomalen DNA.
Nach einer Zentrifugation (5 min, Eppendorfzentrifuge) wurden 4/5 VE des klaren Überstandes in neue Eppendorfgefäße transferiert und die Plasmid-DNA mit Isopropanol präzipitiert. Das Pellet wurde in 100 µl Mix III (s. Klonanalyse-Puffer) aufgenommen und die DNA-Lösung durch mehrmalige Extraktion mit einer Chloroform-Isoamylalkohol Mischung (24:1, v/v) von Protein- und SDS-Resten gereinigt.
Die Plasmid-DNA wurde mit Ethanol gefällt und in RP-Puffer (20-40 µl) mit RNAse A (100 µg/ml) resuspendiert. Anschließend konnte die DNA mittels Restriktionsendonukleasen analysiert oder für Transformationsexperimente weiterverwendet werden.

2.16. Kopiezahlbestimmung von Plasmiden

Die Kopiezahlbestimmung von Plasmiden erfolgte nach der DNA-Isolationsmethode von Birnboim und Doly (1979) unter Berücksichtigung der Arbeiten von Weisblum et al., (1979) und Projan et al., (1983).
Das Prinzip der Methode beruht darauf, in vivo radioaktiv markierte Plasmid-DNA von der radioaktiv markierten chromosomalen DNA abzutrennen, die Plasmid-DNA elektrophoretisch auf Agarose-Gelen zu isolieren, die eingebaute Radioaktivität der präparierten DNA-Banden zu messen und mit einem Vergleichsstandard (Mini-F Wildtyp DNA) zu korrelieren.
Um einen vergleichbaren Reproduktionsgrad zu anderen Methoden der Kopiezahlbestimmung von Plasmiden zu erreichen, wurden die folgenden Schritte standartisiert:
1. Als Inokulationsmedium diente ausschließlich M9-Minimalmedium mit 250 µg 2'- Desoxyadenosin pro ml.

2. Alle Radioaktivkulturen hatten ein Volumen von 2,5 ml, enthielten 5 µCi ^{3}H-Thymidin und wurden aus M9-Vorkulturen mit gleichem Zelltiter angeimpft (Starttiter 1 x 10^{6}/ml). Die Vorkulturen waren bei der Inkubationstemperatur gewachsen, bei der auch die Hauptkulturen inkubiert werden sollten (25°C, 38°C oder 42°C).

3. Die Hauptkulturen wurden unter Belüftung 10 Generationen lang bis zu einem Zelltiter von 1 x 10^{9}/ml inkubiert. Der Endtiter wurde bestimmt a) optisch durch Auszählen von Proben aus unmarkierten Parallelkulturen (Neubauer Zählkammer) und b) durch Ausspateln von Verdünnungen der Radioaktivkulturen auf TBY-Platten und Auszählen der Kolonien nach 16 h Inkubation bei 30°C.

Nach Erreichen des Endtiters wurden die Bakterienkulturen mit Eis auf 0°C heruntergekühlt. Jeweils 2 ml Zellen wurden pelletiert (5 min Eppendorfzentrifuge) und 2x mit 200 µl eisgekühltem Mix I (ohne Lysozym) gewaschen.

Anschließend wurden die Bakterien, wie unter 2.15. beschrieben, aufgeschlossen und die Plasmid-DNA isoliert.

Die Plasmid-Isolate wurden in jeweils 100 µl RP-Puffer mit RNAse A (100 µg/ml) resuspendiert, 30 min bei 37°C inkubiert, mit BPB-Glycerin und SDS (nach Vorschrift, s. 2.10.) vermischt und Anteile der DNA auf vertikalen 1 % Agarose Platten-Gelen (Dicke: 0,5 cm) in TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (55 mA/110 V, Laufzeit ca. 4 h).

Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) eingefärbt, die Plasmid-Banden (CCC-, OC- und L-Form) herausgeschnitten und die Gelstreifen in Corex-Glasröhrchen überführt. Die Gelstreifen wurden getrocknet (6 h, 70°C) und

anschließend in jeweils 0,5 ml Wasserstoffperoxid-Ammoniak-Lösung (19:1, v/v) bei 50°C aufgelöst.
Die Radioaktivität der Proben wurde nach Zugabe von je 5 ml Szintillationsmix im ^{3}H-Kanal eines Szintillationszählers (Phillips, Typ pW4700) gemessen und mit der Einbaurate von gleichartig präparierter Mini-F Wildtyp DNA korreliert.

2.17. Test auf Inkompatibilität

Um Mini-F Mutanten auf ihre Inkompatibilitätseigenschaften zu testen, wurden sie via Transformation in den E. coli recA Stamm MV12 eingeschleust, der das Mini-F Wildtyp Plasmid pML31 (Mini-F' Km^{r}) enthielt.
Selektioniert wurde für das in der Transformation eingesetzte Plasmid und auf die Anwesenheit beider Plasmide (Doppelselektivmedium). Nach 25 h Inkubation bei 25°C wurden jeweils 100 Transformantenklone zum Test auf Anwesenheit von pML31 auf TBY-Km_{50} Medium überimpft, die Platten für 24 h bei 25°C bebrütet und dann ausgewertet.

2.18. Test auf Segregation von Plasmiden

Zum Nachweis der stabilen Erhaltung von Mini-F Plasmiden in ihren Wirtsbakterien oder zur Ermittlung der Segregationsrate von Plasmiden unter Inkompatibilitätsbedingungen wurden Segregationskinetiken erstellt.
Ausgegangen wurde von einer Einzelkolonie des jeweiligen Bakterienwirts, die auf Selektivmedium gewachsen war. Von dieser Kolonie wurden Zellen in TBY-Selektivmedium überimpft und die Kultur bei 25°C, 38°C oder 42°C unter Belüftung bis zur

frühen logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Nach einer Probenentnahme und Ausspateln geeigneter Verdünnungen auf TBY-Medium und TBY-Selektivmedien wurden 5 µl der Zellkultur in 5 ml TBY-Medium (vorgewärmt) transferiert und die Bakterienkultur über 30 Generationen ohne Selektionsdruck wachsen gelassen. Nach jeweils 10 Zellgenerationen wurden Proben genommen, verdünnt und auf TBY- und TBY-Selektivmedien ausgespatelt; gleichzeitig wurde die Hauptkultur $1x10^{-3}$ verdünnt. Die Platten wurden entweder 25 h bei 25°C oder 16 h bei 37°C bebrütet und anschließend ausgewertet.

2.19. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Didesoxy-Methode von Sanger (1977), (s. Smith, 1980) in Verbindung mit der Klonierungstechnik in M13-Phagenvektoren (Messing und Hieira, 1982).

A) DNA- Insertion in die Phagenvektoren M13mp8 und M13mp9

Die Insertion von DNA-Fragmenten in die synthetisch erzeugte Mehrfachschnittsequenz der Phagenvektoren M13mp8 und M13mp9 ist ohne vorherige Modifizierung der Fragmentenden nur möglich mit den Spaltprodukten der Restriktionsendonukleasen EcoRI, PstI, BamHI, SmaI, XmaI, AccI, SalI und HincII bzw. einer Kombination derselben.
Alle zu sequenzierenden DNA-Fragmente wurden auf Agarose-Gelen präparativ isoliert und anschließend mit jeweils 2-3 µg DNA der Phagenvektoren M13mp8 und M13mp9 in 50-100 µl Ligations-Puffer durch T4-Polynukleotid-Ligase neukombiniert. Die DNA

der Phagenvektoren war zuvor von Restriktionsendonukleasen hydrolysiert worden, die die für die Integration von Fremd-DNA komplementären Schnittsequenzen erkennen.

Transformation von E. coli JM103

Als Indikatorstamm für die Phagenvektoren bzw. für die neukombinierte DNA diente der E. coli Stamm JM103. Für die Aufnahme der DNA wurden die Bakterien, wie unter 2.13. beschrieben, mit $CaCl_2$ kompetent gemacht.

Nach Inkubation der Transformationsansätze (jeweils 300 µl, 40 min bei 0°C) wurden die Bakteriensuspensionen ohne einen 42°C-Hitzeschock nach Hinzugabe folgender Substanzen auf TBY-Platten (frisch) ausplattiert.

Je 50 µl Transformationsansatz
100 µl Indikatorbakterien JM103 (ÜK)
10 µl 100 mM IPTG (Isopropyl ß-D-Thiogalactosid)
50 µl 2 % X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-ß-D-Galactosid)
und 3 ml TBY-Weichagar (46°C)

Nach Erstarren des Weichagars wurden die Platten über Nacht (ca 16 h) bei 37°C bebrütet.

Nach der Inkubation können blaue und farblose Zellkolonien (Scheinplaques) im Weichagar identifiziert werden. Transformierte und lysogene Zellen ohne DNA-Insertionen in der Phagen-DNA bilden auf X-Gal Platten blaue Kolonien (Komplementation des ß-Galaktosidase-Gens von JM103 durch das lacZ-Genfragment in den Phagenvektoren; Gronenborn und Messing, 1978). Farblose Bakterienkolonien sind lysogene Zellen, die von M13 Phagenvektoren mit inserierter Fremd-DNA infiziert worden sind (Keine α-Komplementation des ß-Galaktosidase-Gens von JM103 durch den Rekombinanten Phagen).

Klonanalysen zum physikalischen Nachweis eines DNA-Inserts

Obwohl der Bakteriophage M13 ein ss-DNA Phage ist, existiert er in seiner intrazellulären replikativen Form als doppelsträngiges und zirkuläres DNA-Molekül und gleicht darin einem Plasmid Vektor.
Der physikalische Nachweis eines in die Phagenvektoren M13mp8 und M13mp9 inserierten und nachfolgend zu sequenzierenden DNA-Fragments erfolgte durch Analyse von Einzelstrang-DNA (Größenvergleich von M13 ss-DNA mit und ohne Insert) und (wie bei Plasmid-Vektoren üblich) durch Analyse von Doppelstrang (ds)-DNA.

Je 2 ml-Kulturen von E. coli JM103 wurden bei einem Zelltiter von etwa 2 x 10^8/ml mit den Zellen von farblosen Bakterienkolonien (Scheinplaques) infiziert (die Kolonie wurde mit einer Impföse ausgestochen) und als Roller-Kultur für 6 h bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Bakterien in Eppendorfgefäßen abzentrifugiert (Sigma Tischzentrifuge 2MK, 5 min bei 8900 x g). Der Überstand mit den Phagenpartikeln (etwa 5 x 10^{11}/ml) wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß umgefüllt und ein zweites Mal zentrifugiert (obige Bedingungen). Jeweils 30 µl eines Überstandes wurden nach Hinzufügen von 1 µl 2 % SDS und 5 µl Bromphenolblau (in 50 % Glycerin) 5 min auf 65°C erhitzt und auf einem 0,9 % Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (3 h bei 55 mA). In Abhängigkeit von der Größe des Inserts wanderte die Einzelstrang-DNA von Hybridvektoren im Agarose-Gel langsamer, als die Einzelstrang-DNA der M13-Phagen ohne Insert.

Für den gesicherten physikalischen Nachweis eines Inserts in den beiden M13-Vektoren wurde die doppelsträngige intrazelluläre Phagen-DNA analysiert. Dazu wurden die nach Abtrennung des Phagen-haltigen Kulturüberstandes bei $0^{\circ}C$ aufbewahrten Zellpellets in jeweils 150 µl Lysozym Mix I (s. Klonanalyse-Puffer) resuspendiert und die doppelsträngige Phagen-DNA nach der Methode von Birnboim und Doly (1979), (s. 2.14.) isoliert.
Anschließend wurde die DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen fragmentiert und mittels Agarose-Gelelektrophoresen analysiert.

B) DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung eines in die Phagenvektoren M13mp8 und M13mp9 seitenverkehrt zueinander inserierten DNA-Fragments erfolgte nach der Dideoxynukleotid-Strangabbruch Methode von Sanger et al., (1977), (siehe hierzu Smith, 1980).
Bei dieser Methode wird in vitro ein synthetisch erzeugter ss-DNA "Primer" oberhalb der klonierten Inserts an die "Template" DNA der beiden Phagenvektoren M13mp8 und M13mp9 anhybridisiert und anschließend durch Reparatursynthese in 5'- 3' Richtung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I verlängert. Der neusynthetisierte DNA-Strang wird durch den Zusatz von α-(^{32}P)dATP radioaktiv markiert.
Da jeder Reaktionsansatz außer den vier normalen Deoxynukleosid--Triphosphaten auch ein 2'- 3'Dideoxynukleosid enthält, wird die Synthesereaktion durch den statistischen Fehleinbau eines 2'- 3'Dideoxynukleosids in unterschiedlicher Entfernung vom 5'-Ende des "Primers" terminiert. Die Syntheseprodukte werden

anschließend auf denaturierenden Polyacrylamid-Sequenzgelen aufgetrennt.

Isolation der ss-"Template" DNA

Zur Präzipitation der Phagenpartikel aus den bei 5°C aufbewahrten 2 ml Kulturüberständen der Rollerkulturen wurden die Kulturüberstände mit jeweils 210 µl PEG (Polyethylenglykol; 25 % in 3 M NaCl) vermischt und die Suspension 15 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach einer Zentrifugation (5 min, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurden die Überstände vorsichtig abgehoben und die Phagen-Pellets in je 110 µl TES-Puffer resuspendiert.
Zur Beseitigung der Phagenhüllproteine wurde die Suspension zweimal mit einem Gemisch aus Phenol und Chloroform (1:1, v/v) extrahiert und die Phagen-DNA ("Template"-DNA) anschließend mit Ethanol präzipitiert. Die DNA-Pellets wurden mehrmals mit je 200 µl 80 % Ethanol gewaschen, im evakuierten Exsikator getrocknet und in jeweils 11 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. Die ss-DNA "Templates" wurden bis zu den Sequenzierungsreaktionen bei 7°C aufbewahrt.

Markierungs-Reaktionen (Strang-Synthese)

Die folgenden Arbeitsschritte sind zur besseren Überschaubarkeit in Form eines Fließschemas dargestellt (nach Smith, 1980).

-20 µCi α-(^{32}P)dATP (spezifische Aktivität 400 Ci/mMol) in einem Eppendorfreaktionsgefäß eintrocknen (evakuierter Exsikator).

Ansatz: 4 µl "Template"-DNA

2,6 µl ss-Primer (1:4 verdünnt, Endkonzentration 0,5 ug/ul), (PL-Biochemicals)

1 µl 5 M NaCl in 1 M Tris HCl; pH 7,5

2,4 µl H_2O

-15 min Inkubation bei 55°C (Wasserbad)

-den Ansatz langsam (30-45 min) auf Raumtemperatur abkühlen, kurz zentrifugieren (2 sec, Eppendorf-Zentrifuge), in das Eppendorf-Gefäß mit α-(^{32}P)dATP überführen und erneut 2 sec zentrifugieren.

Markierungsansätze:

	A	C	G	T
Reaktions-Mix (PL)	4,5µl	4,5µl	4,5µl	4,5µl
"Template"-DNA / (^{32}P)dATP	2µl	2µl	2µl	2µl
DNA-Polymerase I -Klenow-Fragment (1:4 verdünnt auf ca. 0,23 Einheiten/µl), (Boehringer)	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl

-5 sec Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge), 40 min Inkubation bei Raumtemperatur

-pro Ansatz Zugabe von 1,5 µl "Chase"-Lösung (PL) an die Wand der Reaktionsgefäße, 2 sec Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge), 15 min Inkubation bei Raumtemperatur

-Zugabe von je 1 µl EDTA (250 mM), 2 sec Zentrifugation

-Ethanolfällung (Zusatz von je 5 µg t-RNA)

-Pellets trocknen und in jeweils 5 µl Farbmarker für Sequenzierungsgele resuspendieren.

Die DNA-Proben lassen sich in dieser Form mehrere Tage bei -20°C aufbewahren.

Vor dem Auftragen auf das Sequenzierungs-Gel wurden die Ansätze aufgetaut und halbiert, 5 min bei 100°C inkubiert und zentrifugiert (2 sec, Eppendorf-Zentrifuge).

Acrylamid-Gelelektrophorese

(modifiziert nach Sanger und Coulson, 1978)

Die Sequenzierungsgele waren 70 cm lang, 20 cm breit und 0,5 mm dick. Die Acrylamid-Bisacrylamid-Konzentration im Gel betrug 6% in 6 M Harnstoff. Für alle Elektrophoresen wurde das Tris-Borat Puffer-System von Sanger und Coulson (1978) verwendet.

Die Acrylamid-Gele hatten folgende Zusammensetzung und wurden aus Stammlösungen hergestellt.

Für ca. 150 ml:

63 g Harnstoff (p.a.)

23,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (20:1 w/w)

15 ml TBE-Puffer, pH 8,3

36,5 ml H_2O

Die Lösung wurde entgast und auf 0°C heruntergekühlt, dann wurden 990 µl Ammoniumpersulfat (23,6 mg/ml H_2O) und 135 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) hinzugegeben.

Jedes Gel wurde in einem 30° Neigungswinkel zwischen zwei Spiegelglasplatten gegossen, die durch Teflonstreifen (0,5 mm Dicke) getrennt und an drei Seiten abgedichtet waren. Die "Ohrenplatte" war zuvor silikonisiert worden. Nach dem Einführen des Probenkammers (Teflon) konnte das Gel bei Raumtemperatur über Nacht in waagerechter Lage durchpolymerisieren.

Vor der Elektrophorese wurden die Taschen des Sequenzgels mit

7 M Harnstoff gefüllt.

Nach einem Vorlauf (1 h, 15 mA/etwa 1300 V; TBE-Puffer für Sequenzgele; pH 8,3) wurde der Harnstoff aus vier benachbarten Probentaschen entfernt und die erste Hälfte der radioaktiv markierten DNA-Proben in der Reihenfolge A, C, G, T von links nach rechts aufgetragen. Nach etwa 4 h Laufzeit bei einer Stromstärke von 15 mA/etwa 1300 V (der BPB-Farbmarker erreicht dann den unteren Gel-Rand) wurde die Elektrophorese unterbrochen, der Harnstoff aus vier unbenutzten Geltaschen entfernt und die anderen Hälften der DNA-Proben in der obigen Reihenfolge aufgetragen.

Nach weiteren 4 h wurde die Elektrophorese beendet, das Gel aus der Elektrophorese-Kammer genommen und die silikonisierte "Ohrenplatte" vorsichtig abgehoben.

Das Gel wurde mit Frischhaltefolie (faltenfrei) abgedeckt und nach dem Auflegen eines Röntgenfilms (Typ Kodak X-Omat XAR5) im Dunkeln bei -20°C für 12-48 h exponiert.

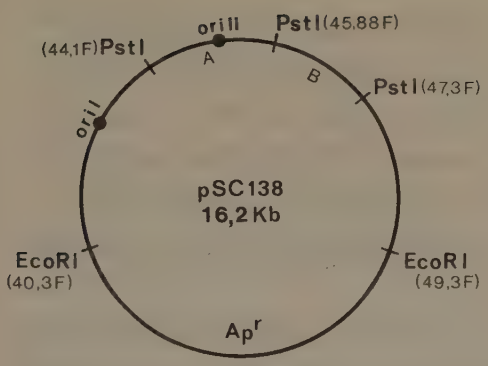
3. Resultate

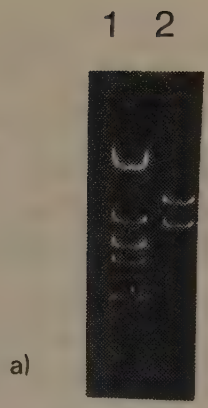
3.1. Isolation von Mini-F Mutanten mit erhöhter Kopiezahl

Die chemisch induzierte Mutagenese von DNA-Molekülen ist in Verbindung mit einem geeigneten Selektionssystem, neben der alternativen Technik der Transposon-Mutagenese (Insertion von transponierbaren DNA-Elementen in ein Genom) eine häufig gewählte und sehr effiziente Methode zur Erzeugung von Mutationen in einem Genom.
In diesem Zusammenhang hat sich die *in vitro* Mutagenese von gereinigter Plasmid-DNA mit dem chemischen Agens Hydroxylamin als zweckmäßig erwiesen. Hydroxylamin induziert in der DNA vorwiegend Punktmutationen mit der Spezifität einer Transition in der Nukleotidpaarung von G-C nach A-T (Freese et al., 1961). Im Gegensatz zur *in vivo* Mutagenese von Plasmid-haltigen Zellkulturen durch andere chemische Substanzen, wie z.B. Nitrosoguanidin, kann mit der gewählten Methode eine gleichzeitige Mutagenese der chromosomalen DNA mit eventuellen Auswirkungen auf die Plasmid-Replikation ausgeschlossen werden.

Zur Isolation von Mini-F Mutanten mit erhöhter und konditional erhöhter Kopiezahl wurden die beiden Plasmide pSC138 (Timmis et al., 1975) und pJE3011 (s. Abb.3), ein Derivat des Mini-F Plasmids pJE3001 (Ebbers und Eichenlaub, 1981) verwendet.

Während das Plasmid pSC138 das komplette Mini-F Genom (40.3-49.3 F) enthält, handelt es sich bei dem Plasmid pJE3011 um ein Deletionsderivat von Mini-F, dessen Mini-F Teil auf 3,2 Kb reduziert ist (44.1-47.3 F) und aus den beiden benach-





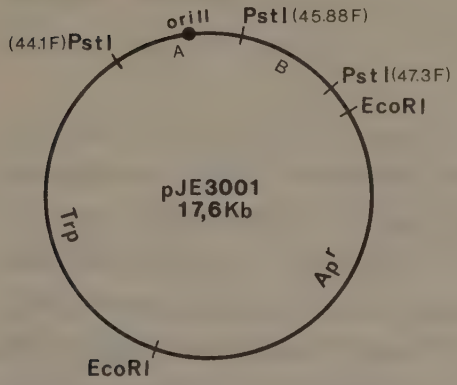


Abb.3: Physikalische Karten der Mini-F Plasmide pSC138 (16.2 Kb) und pJE3011 (17.6 Kb). Das PstA und PstB Fragment von Mini-F mit den begrenzenden F-Koordinaten ist bei beiden Plasmiden markiert. Selektive Marker: Ap^r=Ampicillin-Resistenz, Trp=Tryptophan Synthese. Die Abbildungen neben den zugehörigen Karten zeigen die auf einem 1% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennte Plasmid-DNA von a) pSC138 und b) pJE3011. Die Größenangabe der DNA Fragmente erfolgt von oben nach unten:

a) Spur 1: Phage λDNA-EcoRI (Molekulargewichtsmarker)
   Spur 2: pSC138-EcoRI (9 Kb, 7.2 Kb)

b) Spur 1: λ DNA-EcoRI; 2: pJE3011-EcoRI (17.6 Kb);
   3: pJE3011 PstI (14.4 Kb; 1.7 Kb; 1.5 Kb); 4: pJE3011-PstI partiell hydrolysiert, (14.4 Kb; 3.2 Kb; 1.7 Kb; 1.5 Kb).

barten PstI- Fragmenten mit den F-Koordinaten 44.1-45.88 (A-Fragment) und 45.88-47.3 (B-Fragment) besteht (s. Abb.3). Diese 3.2 Kb umfassende Mini-F Region enthält den Origin II, den incB- und incC-Locus, kodiert für das E- und möglicherweise auch für das A-Protein von Mini-F und verfügt damit über alle gegenwärtig bekannten und für die Replikation von Mini-F notwendigen Funktionen.
Die leichte Instabilität von pJE3011 - etwa 4-6 % Segregation pro Zellgeneration - kann auf die fehlenden, in der DNA-Region 47.3-49.3 F lokalisierten Verteilungsfunktionen von Mini-F zurückgeführt werden (Ogura und Hiraga, 1983; Austin und Wierzbicki, 1983).

Die beiden Mini-F Plasmide pSC138 und pJE3011 enthalten ein Marker-Gen, das für das Ampicillin inaktivierende Enzym ß-Lactamase kodiert. Mini-F Mutanten mit erhöhter Kopiezahl sollten aufgrund einer gesteigerten ß-Lactamase Produktion (Gen-Dosis Effekt) dem Wirt einen höheren Resistenzgrad vermitteln und auf diese Weise phänotypisch leicht von Mini-F Wildtyp Plasmiden mit niedriger Kopiezahl unterscheidbar sein.
Entsprechende Vorversuche hatten gezeigt, daß eine Ampicillin Konzentration von 100 µg/ml Medium das Wachstum von E. coli Bakterien mit Mini-F Wildtyp Plasmiden unterdrückt.

3.1.1. Isolation von Mini-F Kopiezahlmutanten

Für die in vitro Mutagenese mit Hydroxylamin wurde gereinigte Plasmid-DNA von pSC138 und pJE3011 auf mehrere gleichartige Reaktionsansätze verteilt, die zwischen 15 und 60 min bei

70°C inkubiert wurden. Nach einer Dialyse wurde die behandelte Plasmid-DNA zur Transformation der E. coli Stämme C600 und RH2358 weiterverwendet. Der Stamm RH2358 supprimiert amber-Mutationen in Abhängigkeit von der Wuchstemperatur (bei 25°C su^+, bei 42°C su^-; Delcuve et al., 1977). Die Selektion der Transformanten erfolgte bei 25°C auf TBY-Platten mit 50 µg Ampicillin/ml.
Wie zu erwarten war, lag die Transformationsfrequenz der mit Hydroxylamin behandelten Mini-F DNA deutlich ($1x10^{-1}$ - $1x10^{-2}$) unter der Transformationsfrequenz von vergleichbarer unbehandelter Mini-F DNA.

Zum Screening auf Kopiezahlmutanten von Mini-F mit einer thermosensitiven oder supprimierbaren Mutation wurden 4000 Zellklone auf TBY-Medium mit 900 µg Ampicillin/ml überimpft und bei 25°C und 42°C bebrütet.
Von den 4000 getesteten Klonen zeigten 78 (1,9 %) eine erhöhte Ampicillinresistenz, wobei 51 Klone aus Transformationsexperimenten mit mutagenisierter pJE3011 DNA und die restlichen 27 Klone aus Experimenten mit mutagenisierter pSC138 DNA abstammten.
Keiner der 78 isolierten Bakterienklone besaß einen thermosensitiven Resistenz-Phänotyp, wuchs also unter den gewählten Selektionsbedingungen entweder nur bei 25°C oder 42°C Inkubationstemperatur. Da dies für beide transformierte E. coli Stämme zutraf, kann man annehmen, daß für die Ausprägung eines thermosensitiven oder supprimierbaren Cop^--Phänotyps von Mini-F mehrere Mutationsereignisse und diese eventuell noch in einer bestimmten Kombination erforderlich sein müssen.

Die physikalische und qualitative Charakterisierung der selektionierten Kopiezahlmutanten von pSC138 und pJE3011 erfolgte im Rahmen mehrerer Klonanalysen. Dabei wurden die aus Zellkulturen gleichen Titers isolierten DNA-Mengen von Kopiezahlmutanten und entsprechenden Mini-F Wildtyp Plasmiden nach ihrer Auftrennung auf Agarose Gelen miteinander verglichen (s. Abb.4). Auf diese Weise konnte die intrazelluläre Plasmidkonzentration der Kopiezahlmutanten abgeschätzt werden. Gleichzeitig ermöglichte diese Methode die Identifizierung von Mini-F Plasmiden, deren Kopiezahl gegenüber dem Wildtyp unverändert war, obwohl die Ampicillinresistenz der Bakterienwirte erhöht war. Vermutlich werden bei diesen Mutanten durch eine Promoter-Mutation erheblich größere Mengen ß-Lactamase gebildet und so ein Cop^--Phänotyp vorgetäuscht.

Von den identifizierten Kopiezahlmutanten der beiden Mini-F Plasmide pSC138 und pJE3011 wurde jeweils eine mit einer gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhten Kopiezahl für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt. Eine Kopiezahlbestimmung dieser Mutanten sollte später erfolgen (s. 3.2.2.). Die Kopiezahlmutanten erhielten die Bezeichnung pJE138 (Derivat von pSC138) und pJE3021 (Derivat von pJE3011) (s. Abb.4).

Um zu gewährleisten, daß der Cop^--Phänotyp der beiden ausgewählten Mini-F Mutanten auf Mutationen im Plasmid Genom und nicht auf eventuelle Spontanmutationen in der chromosomalen DNA zurückzuführen ist, wurde der E. coli Stamm C600 mit gereinigter DNA dieser Plasmide retransformiert.
Alle getesteten Bakterienklone besaßen wieder eine hohe Ampicillinresistenz, unabhängig davon, ob die eingeschleuste Mini-F DNA aus dem E. coli Stamm C600 oder RH2358 isoliert worden war.

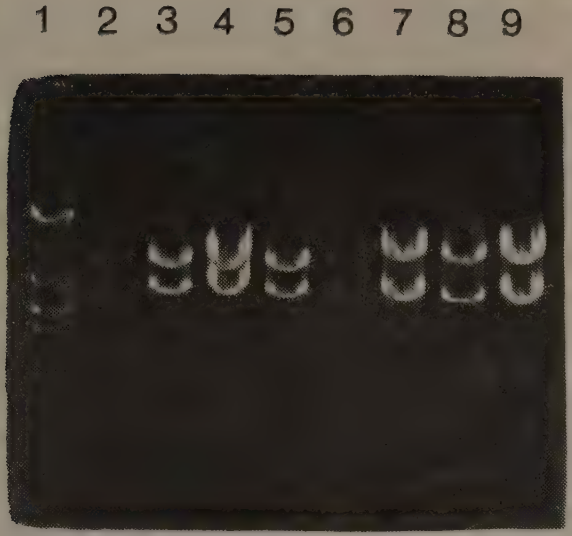


Abb.4: Agarose Gelelektrophorese zum qualitativen Nachweis des Cop⁻-Phänotyps von Mini-F Plasmiden.
Die Plasmid-DNA wurde aus jeweils 1 ml E. coli-Zellen (Endtiter 2 x 10^9 Zellen/ml), die bei 37°C in TBY-Medium gewachsen waren, isoliert. Jedes Plasmid-Präparat wurde von der Restriktionsendonuklease EcoRI hydrolysiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA auf einem 1% Agarose-Flachgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die von dem Mini-F Wildtyp Plasmid pSC138 abstammenden Kopiezahlmutanten wurden pJE138, pJE138-1 und pJE138-2 benannt, die von pJE3011 abstammenden Mutanten wurden pJE3021, pJE3021-1 und pJE3021-2 benannt.

Spur 1: λ-DNA-EcoRI
2: pSC138 (Wildtyp)
3: pJE138
4: pJE138-1
5: pJE138-2
6: pJE3011 (Wildtyp)
7: pJE3021
8: pJE3021-1
9: pJE3021-2

3.1.2. Isolation thermosensitiver Kopiezahlmutanten von Mini-F

Nach der ersten Mutagenese von Mini-F DNA konnten keine konditionalen Kopiezahlmutanten selektiert werden. Es mußte angenommen werden, daß für die Ausprägung eines derartigen Cop-Phänotyps in verschiedenen Gen-Loci von Mini-F Mutationen induziert werden müssen. Da die Wahrscheinlichkeit für die gleichzeitige Mutation dieser Gene nach einmaliger *in vitro* Mutagenese der DNA nur sehr klein ist, sollten Kopiezahlmutanten von Mini-F erneut mutagenisiert werden.
Unterstützt wurde diese Versuchsänderung durch Mutagenese-Experimente mit Mini-Derivaten des Antibiotikaresistenz-Faktors R1drd-19. Das Plasmid R1drd-19 hat gleich dem F-Faktor eine niedrige Kopiezahl, es wird also in seiner Replikation streng reguliert. Von diesem Plasmid konnte nach erneuter Mutagenese einer Kopiezahlmutante ein völlig anderer Mutanten-Typ isoliert werden. Diese als "Run away"-Replikationsmutanten bezeichneten R1drd-19 Derivate erhöhen ihre Kopiezahl in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und replizieren bei Temperaturen über 35°C so unkontrolliert, daß die intrazelluläre Konzentration an Plasmid-DNA das Wachstum des *E. coli* Bakteriums inhibiert und schließlich den Zelltod verursacht (Uhlin und Nordström, 1978).

In den folgenden Experimenten wurde die Plasmid-DNA der beiden Mini-F Kopiezahlmutanten pJE138 und pJE3021 mit Hydroxylamin behandelt und der *E. coli* Stamm C600 mit der DNA beider Plasmide transformiert. Die Selektion und das nachfolgende Screening auf Transformanten mit temperaturabhängiger Ampicillinresistenz, als phänotypisches Kennzeichen für Plasmid Mutanten mit thermo-

sensitiver Kopiezahl, erfolgte in der zuvor beschriebenen Art und Weise.

Aus drei Mutagenese- und Transformations-Experimenten wurden zehn Bakterienklone (1,3 % der getesteten Klone) erhalten, die nach Überimpfung auf TBY-Medium mit 900 µg Ampicillin/ml bei 25°C, jedoch nicht mehr bei 42°C Inkubationstemperatur wachsen konnten. Sechs der zehn erhaltenen Zellklone stammten aus Transformationen von E. coli C600 mit mutagenisierter pJE3021 DNA.

Nachfolgende Klonanalysen bestätigten die Annahme, daß der Phänotyp aller 10 isolierten Bakterienklone auf temperaturabhängige Kopiezahlschwankungen der entsprechenden Mini-F Plasmide zurückzuführen ist. Jeweils eine der von Mini-F pJE138 und pJE3021 abstammenden thermosensitiven Kopiezahlmutanten wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die beiden Plasmide erhielten die Bezeichnung pJE139 und pJE3022.

Abbildung 5 zeigt ein Agarose-Gel, auf dem die aus 25°C und 42°C-Zellkulturen gleichen Titers isolierte Plasmid-DNA von Mini-F Wildtyp Plasmiden (pSC138, pJE3011) Cop-Mutanten (pJE138, pJE3021) und thermosensitiven Cop-Mutanten (pJE139, pJE3022) aufgetrennt wurde.
Wie zu erkennen ist, differieren (im Gegensatz zu ihren Elterplasmiden) die aus 25°C- und 42°C-Zellkulturen isolierten DNA-Mengen von pJE139 und pJE3022 um ein Mehrfaches.
Vergleicht man die aufgetrennten DNA-Mengen von Cop und Cop_{ts}-Mutanten miteinander, so fällt auf, daß die Plasmidmenge der beiden Cop_{ts}-Mutanten aus 25°C-Kulturen größer ist, als

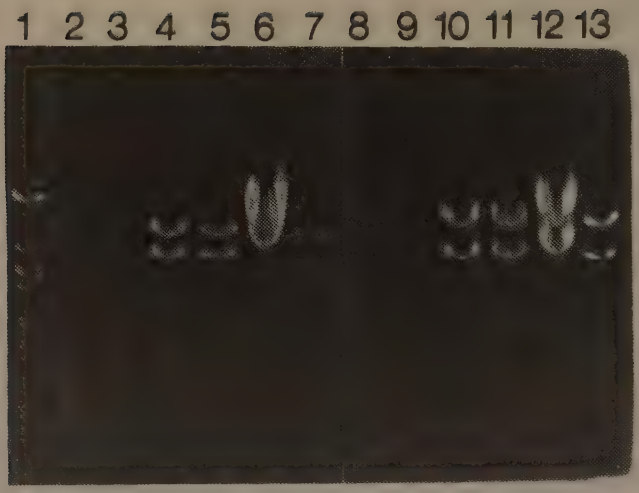


Abb.5: Agarose-Gelelektrophorese zum Vergleich der intrazellulären Plasmidkonzentration von Mini-F Wildtyp Plasmiden (pSC138 und pJE3011), Cop-Mutanten (pJE138 und pJE3021) und Cop_{ts}-Mutanten (pJE139 und pJE3022) bei 25°C und 42°C Inkubationstemperatur. Die Plasmidpräparate wurden aus jeweils 1 ml E. coli-Zellen (Endtiter 2 x 10^9 Zellen/ml) isoliert und vor der elektrophoretischen Auftrennung durch die Restriktionsendonuklease EcoRI hydrolysiert.

			Phänotyp
Spur 1:	λ-DNA-EcoRI		
2:	pSC138-25°C	3: pSC138-42°C	(Cop^+)
4:	pJE138-25°C	5: pJE138-42°C	(Cop^-)
6:	pJE139-25°C	7: pJE139-42°C	(Cop^-_{ts})
8:	pJE3011-25°C	9: pJE3011-42°C	(Cop^+)
10:	pJE3021-25°C	11: pJE3021-42°C	(Cop^-)
12:	pJE3022-25°C	13: pJE3022-42°C	(Cop^-_{ts})

Da einzelne Gelspuren mit Plasmid-DNA überladen sind, ergeben sich Änderungen in der Bandierungshöhe physikalisch identischer DNA-Fragmente (s. Spur 6 und 7).

die der zuvor isolierten Cop-Mutanten pJE138 und pJE3021. Hingegen sind die isolierten Plasmid-Mengen der Cop_{ts}-Mutanten aus 42°C -Zellkulturen kleiner, als die der Cop-Mutanten aber größer als die der entsprechenden Wildtyp Plasmide. Diese Beobachtung wurde sowohl bei einem Vergleich der DNA-Präparate aus logarithmisch wachsenden als auch aus stationären Zellkulturen gemacht.
Der qualitative Unterschied in der Kopiezahlerhöhung der untersuchten Mini-F Mutanten ist also von der jeweiligen Wuchsphase des Bakterienwirts unabhängig.

3.2. Charakterisierung der Kopiezahlmutanten von Mini-F

3.2.1. Untersuchung der Segregationseigenschaften der thermosensitiven Kopiezahlmutanten pJE139 und pJE3022

Mehrere vergleichende Klonanalysen hatten gezeigt, daß die isolierbaren Plasmid Mengen von pJE139 bzw. pJE3022 aus 25°C- und 42°C-Kulturen deutlich voneinander abweichen. Diese Differenz in der DNA-Ausbeute könnte aus einer verstärkten Segregation dieser Mutanten bei 42°C Wuchstemperatur resultieren. Daher wurde die stabile Vererbung von pJE139 und pJE3022 in Form von Segregationskinetiken überprüft.
Die Auswertung diser Experimente ergab, daß beide Kopiezahlmutanten über 30 Generationen hinweg sowohl bei 25°C als auch bei 42°C Inkubationstemperatur stabil in ihren Wirts-Bakterien erhalten bleiben.
In diesem Merkmal unterscheidet sich das getestete Mini-F Plasmid pJE3022 eindeutig von seinem Elter-Plasmid pJE3011, das wegen der fehlenden, auf dem Mini-F Genom zwischen

47.3-49.3 F lokalisierten Verteilungsfunktionen instabil ist und das pro Zellgeneration mit einer Rate von 4-6 % segregiert (analog dem Mini-F Derivat pJE3001, Ebbers und Eichenlaub,1981). Als Ursache für die neu gewonnene Stabilität von pJE3022 mußte eine auch bei 42°C noch über dem Wildtyp Niveau liegende Kopiezahl dieser pJE3011-Mutante angenommen werden. Die verminderte Präzision in der Verteilung kann dann durch eine höhere Anzahl von Plasmid-Molekülen ausgeglichen werden.

3.2.2. Kopiezahlbestimmung von Mini-F Mutanten

Es gibt verschiedene Methoden, um die Anzahl von Plasmid-Molekülen, d.h. ihre Kopiezahl, in einer Zelle zu bestimmen. Jede dieser Methoden basiert auf einem der drei folgenden Prinzipien: a) die Abtrennung der Plasmid DNA von der chromosomalen DNA (z.B. durch Dichtegradienten Zentrifugation); b) verschiedene DNA-Hybridisierungstechniken oder c) die Kalkulation der Kopiezahl nach dem Gen-Dosis Effekt (z.B. durch quantitative Bestimmung der Antibiotikaresistenz des Wirtsbakteriums). Keine dieser Methoden ermöglicht eine genaue Kopiezahlbestimmung für Plasmide, bzw. geeignete Verfahren sind experimentell sehr aufwendig.
Da die geplanten Messungen nur den Unterschied in der Kopiezahl von Mini-F Wildtyp Plasmiden und der analysierten Kopiezahlmutanten quantifizieren sollten und sich die DNA-Isolationsmethode von Birnboim und Doly (1979) aufgrund ihres hohen Reproduktionsgrades als sehr geeignet bei der qualitativen Bestimmung des Cop-Phänotyps der verschiedenen Mini-F Mutanten erwiesen hatte, wurde diese Methode für die Kopiezahlbestimmung von Plasmiden modifiziert und standartisiert (s. 2.16.).

Dies geschah unter Berücksichtigung der Methoden von Weisblum et al., (1979) und Projan et al., (1983).

Zur Bestimmung der intrazellulären Kopiezahl der Mini-F Mutanten bei verschiedenen Wuchstemperaturen wurden Plasmid-haltige Zellkulturen unter identischen Wuchsbedingungen über mehrere Zellgenerationen hinweg mit ^{3}H-Thymidin radioaktiv markiert. Die Plasmid-DNA jeder Kultur wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) gewonnen und auf 1 % Agarose Gelen elektrophoretisch von Resten der chromosomalen DNA abgetrennt. Die Gelstreifen mit der Plasmid-DNA wurden durch Ammoniak-Wasserstoffperoxid aufgelöst und die radioaktive Einbaurate der Plasmid-DNA im Szintillationszähler gemessen. Als Vergleichsstandart bei allen Experimenten diente radioaktiv markierte Plasmid-DNA des Mini-F Wildtyp Plasmids pSC138. Die erhaltenen Meßwerte wurden korreliert und die relative Kopiezahl der Mini-F Kopiezahlmutanten im Verhältnis zum Wildtyp nach folgender Gleichung berechnet. Als durchschnittliche Kopiezahl von pSC138 pro Zelle wurde ein Wert von 1,5 angenommen.

$$Kp = \frac{MG_x \times N_x \times cpm_x}{MG_{138} \times N_{138} \times cpm_{138}} \times 1,5$$

In dieser Gleichung ist Kp die berechnete Kopiezahl eines Plasmids; MG_x bzw. MG_{138} sind die Molekulargewichte der Mutante bzw. von pSC138 (10.8×10^6 D); N_x bzw. N_{138} sind die gemessenen Titer der Wirtsbakterien von der Mutante bzw. von pSC138; und cpm_x bzw. cpm_{138} sind die Zählimpulse/Minute von der Plasmid DNA der Mutante bzw. von pSC138.

Für jedes Plasmid wurden zwei, bei starken Abweichungen drei vergleichende Kopiezahlmessungen durchgeführt. Die Meßresultate

Tabelle 3 Kopienzahl von Mini-F Derivaten in Abhängigkeit vom Cop-Phänotyp

Plasmid	MG ($\times 10^6$ D)	Phänotyp	Mini-F Koordinaten	Kopienzahl pro Zelle a) absolut bei: 25°C	38°C	42°C	b) in Relation zu pSC138 bei: 25°C	38°C	42°C
pSC138	10,5	Cop^+	40.3-49.3 F	1,5	1,5	1,5	1	1	1
pJE3011	11,7	Cop^+	44.1-47.3 F	1,2	-	1,2	0,8	-	0,8
pJE138	10,5	Cop^-	40.3-49.3 F	15	-	13,5	10	-	9
pJE3021	11,7	Cop^-	44.1-47.3 F	13,5	-	13,5	9	-	9
pJE139	10,5	Cop^-_{ts}	40.3-49.3 F	36	-	6	24	-	4
pJE3022	11,7	Cop^-_{ts}	44.1-47.3 F	42	-	6	28	-	4
pJE253	4,3	Cop^-_{ts}	44.1-47.3 F	54	16,5	6	36	11	4
pJE257	10,3	(Cop^+)	44.1-47.3 F 40.3-49,3 F	4,2	-	3,5	2,8	-	2,3
pJE267-1	4,3	Cop^-_{ts}	44.1-47.3 F	52	3	-	35	2	-
pJE267-3	4,3	Cop^-_{ts}	44.1-47.3 F	55	4	-	37	2,7	-

wurden gemittelt. Der Reproduktionsgrad der gemessenen Werte von etwa ± 20 % war akzeptabel und lag im Bereich der Meßgenauigkeit anderer Methoden (s. Projan et al., 1983).

Die in Tabelle 3 aufgelisteten Meßwerte lassen eine etwa zehnfache Zunahme der intrazellulären Plasmidkonzentration der beiden untersuchten Cop-Mutanten pJE138 und pJE3021 gegenüber dem Wildtyp erkennen. Die berechnete Kopiezahldifferenz zum Wildtyp bleibt sowohl bei 25°C- als auch bei 42°C Inkubationstemperatur nahezu gleich.
Für die beiden getesteten thermosensitiven Kopiezahlmutanten pJE139 und pJE3022 konnte eine deutliche Abnahme der intrazellulären Plasmidkonzentration von 25°C- zu 42°C-Zellkulturen festgestellt werden. So vermindert sich die errechnete durchschnittliche Molekülzahl bei pJE139 von etwa 36 (25°C) auf 6 Kopien pro Zelle (42°C) und bei pJE3022 von etwa 42 (25°C) auf ebenfalls 6 Kopien pro Zelle (42°C). Die Kopiezahl beider Mutanten wird also auch bei hoher Wuchstemperatur nicht so streng reguliert, wie dies beim Wildtyp pSC138 der Fall ist.

Anhand der erhaltenen Meßresultate konnten die unterschiedlichen Phänotypen der Cop- und Cop_{ts}-Mutanten von Mini-F eindeutig voneinander und zum Wildtyp-Genom abgegrenzt werden.

3.2.3. Inkompatibilitäts-Eigenschaften der Kopiezahlmutanten von Mini-F

Inkompatibilität von Plasmiden ist wahrscheinlich nur die Folge einer wechselseitigen Beeinflussung von Kontrollfunktionen für Replikation und Verteilung dieser DNA-Moleküle,

dies wurde einleitend erwähnt.
In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die mutierten Cop-Funktionen der untersuchten Mini-F Mutanten die F-spezifische Inkompatibilität dieser Plasmide beeinflussen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde der E. coli recA Stamm MV12 mit dem Mini-F Wildtyp Plasmid pML31 (Mini-F'Km^r) mit der DNA der Cop- und Cop_{ts}-Mutanten pJE138, pJE139, pJE3021 und pJE3022 transformiert. Die anschließende Selektion der transformierten Zellen erfolgte auf das hereinkommende Plasmid (Ap-Medium), und auf die Anwesenheit beider Mini-F Plasmide (Km/Ap-Doppelselektivmedium). Die Bebrütungstemperatur für dieses und die folgenden Experimente war 25°C.
Von den auf Ampicillin-Medium selektionierten Klonen wurden jeweils 100 auf TBY-Kanamycin Platten überimpft, um die gleichzeitige Anwesenheit von pML31 und der eingeschleusten Kopiezahlmutanten zu überprüfen. Die Platten wurden 24 h bei 25°C inkubiert und anschließend ausgewertet.
Die Auswertung der Platten ergab, daß nur noch 2-3 % der getesteten Transformanten-Klone die von pML31 kodierte Kanamycin-Resistenz expremierten. Daraus kann gefolgert werden, daß zwischen dem Wildtyp Plasmid und allen getesteten Kopiezahlmutanten von Mini-F eine Inkompatibilitätsreaktion stattgefunden hat.

Anschließend wurde untersucht, ob die unterschiedlich hohe Kopiezahl von Mini-F Wildtyp und der Kopiezahlmutanten unter Inkompatibilitätsbedingungen zu einer asymmetrischen Verteilung der Tochtermoleküle von pML31 (Wildtyp) und der Kopiezahlmutanten auf die nachfolgenden Zellgenerationen eines Bakteriums

führt. Dazu wurden vier der zuvor auf Doppelselektivmedium isolierten Zellklone, die neben dem Plasmid pML31 jeweils eine der untersuchten Kopiezahlmutanten enthielten, über 20 Generationen hinweg ohne Selektionsdruck bei 25°C kultiviert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Zellproben genommen und auf TBY, TBY-Ap, TBY-Km und TBY-Ap/Km Medium ausplattiert. Die Platten wurden bei 25°C inkubiert und nach 24 h ausgewertet.
Entgegen der Erwartung konnte bei allen durchgeführten Segregationskinetiken eine nahezu symmetrische Aufteilung von pML31 und den vier getesteten Kopiezahlmutanten von Mini-F auf die nachfolgenden Zellgenerationen festgestellt werden. Im Falle der mutierten pJE3011-Derivate wurde sogar eine leichte Ungleichverteilung zugunsten des Mini-F Wildtyp Plasmids pML31 beobachtet.
Diese Befunde lassen vermuten, daß die Kopiezahl der untersuchten Mini-F Mutanten in Anwesenheit eines Wildtyp-Genoms verändert wird und möglicherweise auf das Wildtyp-Niveau absinkt.

Die Versuche, anhand von Klonanalysen die Kopiezahl der Mini-F Mutanten unter Inkompatibilitätsbedingungen zu bestimmen, scheiterten, da unter Doppelselektionsdruck die Bakterienwirte extrem anormal wuchsen und keine hochtitrigen Zellkulturen erhalten werden konnten.
Nachfolgende Experimente, bei denen die Inkompatibilitätsbarriere umgangen wurde, ermöglichten jedoch eine Bestätigung der obigen Annahme (s. 3.7.).

3.3. Konstruktion von Mini-F Klonierungsvektoren mit thermosensitiver Kopiezahl

Die cop-Mutationen der Mini-F Mutanten sollten durch *in vitro* Rekombinationsexperimente im Genom kartiert werden. Dafür sollte die Mini-F DNA einer konditionalen Kopiezahlmutante als Replikon eines Klonierungsvektors (mit definierten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen) für die geplanten *in vitro* Manipulationen zugänglich gemacht werden. Bei der Konstruktion dieses Vektors sollte nicht nur seine Verwendung zur weitergehenden Charakterisierung der Mini-F spezifischen Replikationsfunktionen berücksichtigt werden, sondern auch die Möglichkeit zur Integration und Expression von chromosomalen Genen oder anderer Plasmidgene bestehen.

Als Ausgangsplasmid für den geplanten Vektor wurde die Cop_{ts}-Mutante pJE3022 gewählt, deren Mini-F Teil mit einer Größe von 3.2 Kb wesentlich leichter manipuliert und analysiert werden kann, als das komplette Mini-F Genom (9 Kb).
Da die Mini-F DNA von pJE3022 aus zwei benachbarten PstI-Fragmenten besteht, im Folgenden mit Fragment A (44.1-45.88 F) und Fragment B (45.88-47.3 F) bezeichnet (s. Abb.6), kann sie nur sehr umständlich als funktionelle Einheit isoliert und später manipuliert werden. Darum wurde das nach partieller Hydrolyse von pJE3022 DNA durch die Restriktionsendonuklease PstI teilweise noch komplette AB Fragment präparativ isoliert, die ungepaarten Einzelstrangen wurden durch S1-Nuklease abverdaut und die glatten Enden mit EcoRI-Linkern versehen (s.Abb.6). Anschließend wurde das "gelinkerte" Mini-F Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Klonierungsvektors pACYC184 (Chang

und Cohen, 1978), integriert und die rekombinierte DNA in den E. coli Stamm C600 eingeschleust. Das neukonstruierte Plasmid erhielt die Bezeichnung pJE465.

Für den geplanten Mini-F Vektor waren als selektive Marker zwei der drei Antibiotikaresistenz Gene des Klonierungsvektors pBR325 (Bolivar, 1978) vorgesehen. Beide Marker Gene sollten einen phänotypischen Nachweis von Kopiezahlveränderungen (Gen-Dosis Effekt) nach in vitro Manipulation der Mini-F DNA ermöglichen.
Für die kovalente Verbindung der Mini-F DNA von pJE465 mit den Resistenz Markern wurde pBR325 DNA durch die Restriktionsendonukleasen AvaI und PstI gespalten (s. Abb.6). Anschließend wurde das nicht replikative DNA-Fragment von pBR325 (3.3 Kb) mit den Marker Genen isoliert und die ungepaarten Einzelstrangenden durch S1-Nuklease abverdaut.
Der erste Versuch, das ebenfalls präparativ isolierte und mit S1-Nuklease behandelte Mini-F Fragment von pJE465, nach in vitro Rekombination mit dem Marker-Fragment von pBR325, in E. coli Zellen zu etablieren, scheiterte. Möglicherweise inhibieren irreguläre Durchleseprodukte, die von Promotoren innerhalb der pBR325 DNA ausgehen, eine Replikation unter Kontrolle des Mini-F Replikons in dieser Konformation.

Der Versuch, das Mini-F Replikon in die BclI-Schnittstelle des Marker Fragments von pBR325 zu inserieren (wiederum nach zuvoriger Nuklease S1 Behandlung, war erfolgreich (s. Abb.6). Hierfür wurden zuvor die glatten Enden des AvaI-PstI Fragments von pBR325 in vitro kovalent verschmolzen und die rezirkularisierte bzw. polymerisierte DNA anschließend wieder mit der

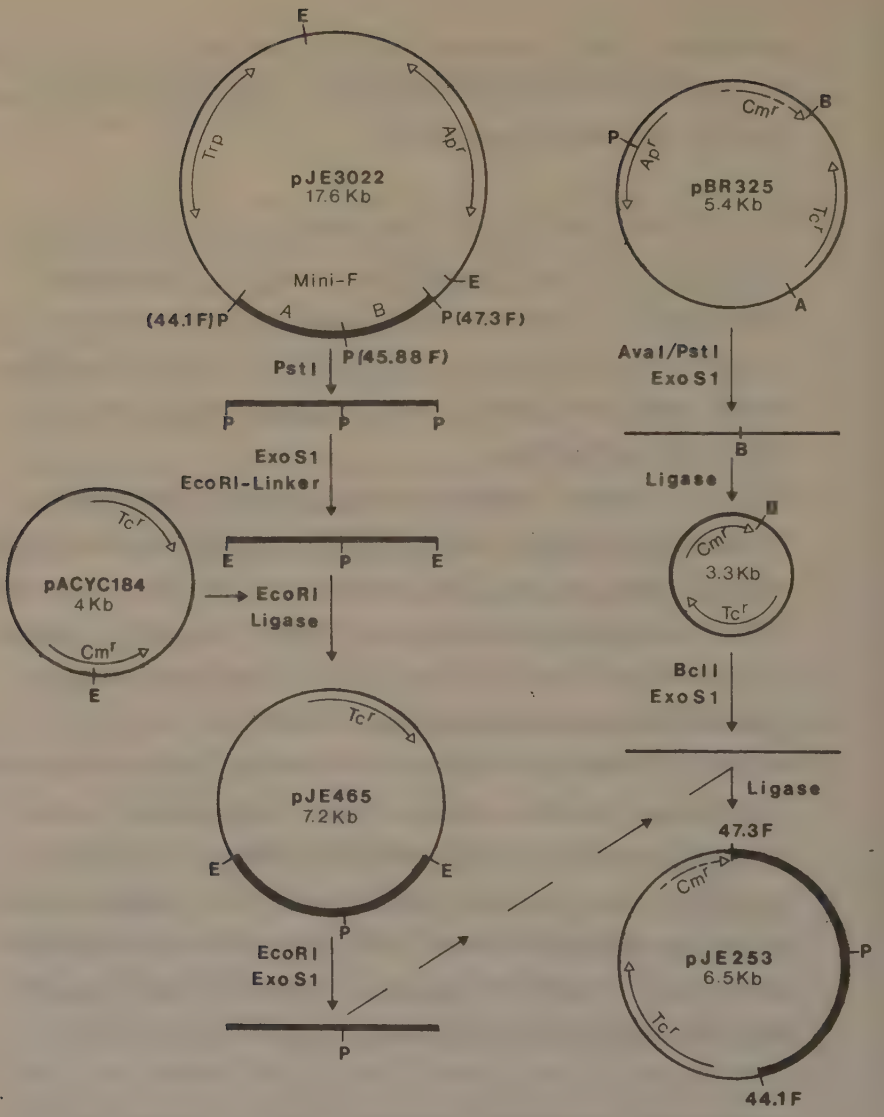


Abb.6: Konstruktion von pJE253.
Das Mini-F PstAB-Fragment (44.1-47.3 F) von pJE3022 ist gekennzeichnet. Abkürzungen für die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen: A = AvaI, B = BclI, E = EcoRI, P = PstI. Marker Gene: Ap^r = Ampicillinresistenz, Cm^r = Chloramphenicolresistenz, Tc^r = Tetracyclinresistenz, Trp = Tryptophansynthese. Einzelheiten zur Konstruktion von pJE253 sind im Text beschrieben.

Restriktionsendonuklease BclI geöffnet.

Das neu konstruierte Plasmid wurde mittels Transformation in den E. coli Stamm C600 eingeschleust und erhielt die Bezeichnung pJE253. Eine vereinfachte physikalisch-genetische Karte von pJE253 zeigt die Abb.7. Der Mini-F Vektor hat eine Größe von 6.5 Kb, kodiert für Chloramphenicol- und Tetracyclin-Resistenz und enthält mehrere Einzelschnittstellen von verschiedenen Restriktionsendonukleasen, in die DNA-Fragmente integriert werden können.
Vergleichende Klonanalysen und Kopiezahlmessungen (bei 25°C und 42°C Inkubationstemperatur) ergaben, daß pJE253 den Cop_{ts}-Phänotyp des Elterplasmids pJE3022 besitzt. Es ist bei 25°C mit etwa 55 Kopien in seiner Wirtszelle vorhanden und vermindert seine Kopiezahl bei 42°C Wuchstemperatur auf etwa 6. Anhand dieser Untersuchungsergebnisse konnte ausgeschlossen werden, daß der thermosensitive Kopiezahldefekt der Mini-F DNA von pJE3022 durch die Modifizierung (Exonuklease S1 Behandlung) der DNA-Enden oder durch die Rekombination mit anderen selektiven Markern verändert worden ist.
Weshalb pJE253 bei 25°C eine höhere Kopiezahl als das Elterplasmid pJE3022 hat (ca. 55 Kopien gegenüber 40 Kopien pro Zelle), ist unbekannt. Möglicherweise kann die Kopiezahl dieser Mutanten durch die Molekülgröße oder durch externe Signale der angekoppelten Marker Gene mitbeeinflußt werden.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß in der Folge zwei weitere, von pJE253 abgeleitete Mini-F Vektoren konstruiert wurden, die beide ein 0.6 Kb großes BglII-EcaI DNA-Fragments des Plasmids pHC79 (Collins und Brüning, 1978) mit der "cos-Schnittsequenz"

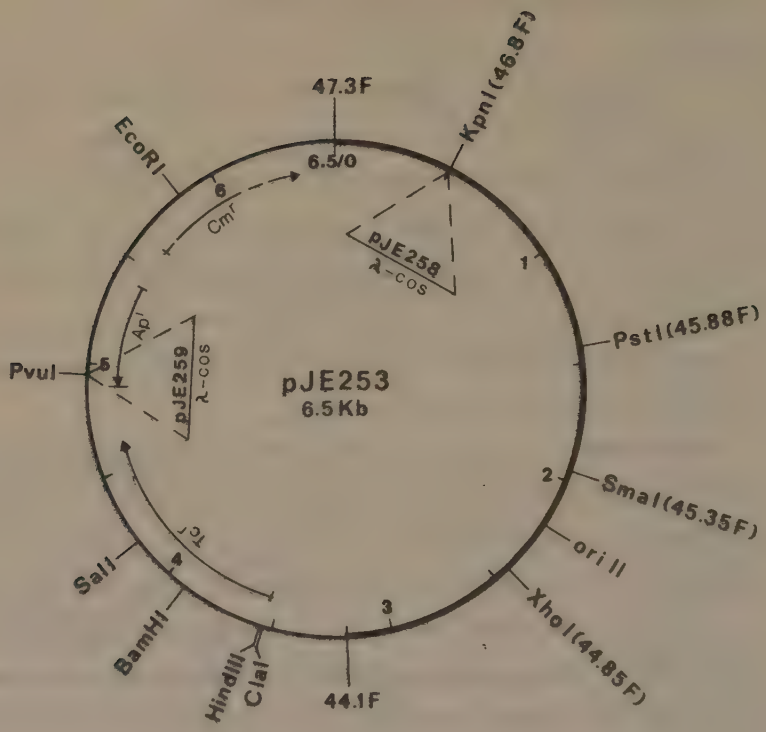


Abb.7: Karte des Mini-F Klonierungsvektors pJE253.
Das Plasmid hat eine Größe von 6.5 Kb. Die Doppellinie kennzeichnet den Mini-F Teil (3.2 Kb) von pJE253. In die Einzelschnittstellen der Restriktionsendonukleasen KpnI, EcoRI, PvuI, SalI, BamHI, HindIII und ClaI kann DNA integriert werden.
Die Transkriptionsrichtung der Marker Gene für Tetracyclinresistenz (Tc^r) und Chloramphenicolresistenz (Cm^r) ist gekennzeichnet. Die Kopiezahl des Vektors kann über die Inkubationstemperatur zwischen 50-60 Kopien (bei 25°C) und 6 Kopien (bei 42°C) moduliert werden.
Die beiden pJE253-Derivate pJE258 und pJE259 enthalten zusätzlich ein 0.6 Kb DNA-Fragment mit der cos-Schnittsequenz des Bakteriophagen λ (BstEII-BglII Fragment von pHC79 ; Collins und Brüning 1978); s. Einschübe im Kreisinnern.

des Bakteriophagen λ inseriert haben (s. Abb.7). Die Plasmide erhielten die Bezeichnung pJE258 (λ-cos Sequenz in der ursprünglichen KpnI-Schnittstelle von pJE253) und pJE259 (λ-cos Sequenz in der ursprünglichen PvuI-Schnittstelle von pJE253). Beide Plasmide besitzen die gleichen phänotypischen Eigenschaften wie pJE253. Sie können jedoch zusätzlich als "Cosmid-Vektoren" für die Anlage von Genbanken, d.h. zur in vitro Verpackung sehr großer DNA-Fragmente (35 - 40 Kb), verwendet werden.
Das dies möglich ist, konnte durch die erfolgreiche in vitro Verpackung der Plasmid DNA von R6K (38 Kb) nach der Methode von Enquist und Sternberg (1979) demonstriert werden (Ebbers und Eichenlaub, in Vorbereitung).
Für weitere Informationen hierzu siehe Hohn und Murray (1977) und Collins und Brüning (1978).

3.4. Kartierung der cop- und cop_{ts}-Mutationen von Mini-F pJE3021 und pJE3022

Um die cop- und cop_{ts}-Mutationen im Genom der isolierten Mini-F Mutanten lokalisieren zu können, wurden mehrere in vitro Rekombinationsexperimente durchgeführt. Hierbei wurden entweder definierte, von Restriktionsendonukleasen erzeugte, DNA-Fragmente einer Kopiezahlmutante gegen homologe Fragmente eines Wildtyp Plasmids bzw. einer anderen Mutante ausgetauscht oder DNA-Fragmente von Mini-F Plasmiden mit unterschiedlichen Cop-Phänotypen in vitro neu kombiniert. In der Regel wurden alle neu zu kombinierenden DNA-Fragmente präparativ isoliert, um Kreuzkontaminationen zu verhindern bzw. auf ein Minimum einzuschränken.

Für die Isolation der verschiedenen Mini-F Wildtyp-Fragmente wurden die pBR322:Mini-F Hybride pJE101 (PstB-Fragment); pJE201 (PstA-Fragment) und pJE401 (alle anderen Mini-F Fragmente) verwendet (Wehlmann und Eichenlaub, 1980).
Nach Transformation geeigneter E. coli Stämme mit der in vitro rekombinierten Plasmid-DNA wurde der Cop-Phänotyp der Mini-F Rekombinanten, falls möglich, durch Überimpfen der Transformanten auf Medien mit hoher und niedriger Antibiotikakonzentration bei 25°C und 42°C Inkubationstemperatur getestet. Anschließend wurden vergleichende Klonanalysen durchgeführt, um die Kopiezahl der Plasmid-Rekombinanten bei 25°C und 42°C zu schätzen.
Alle Austauschexperimente beschränkten sich auf die von pJE3011 abstammenden Kopiezahlmutanten pJE3021 und pJE3022. Anhand der erhaltenen Versuchsdaten sollte es später möglich sein, die Kopiezahlmutanten des komplexeren Mini-F Plasmids pSC138 schneller zu analysieren.

3.4.1. Kartierung der cop-Mutationen von pJE3021 und pJE3022

In einer Folge von Experimenten wurden die PstI-Fragmente A (44.1-45.88 F) und B (45.88-47.3 F) von Mini-F Wildtyp und der beiden Kopiezahlmutanten pJE3021 (Cop^-) und pJE3022 (Cop^-_{ts}) präparativ isoliert. Die A und B Fragmente wurden neu kombiniert und mit einem 7.2 Kb großen Marker Fragment, das die TrpED-Gene von pJE3001 trägt (Ebbers und Eichenlaub, 1981) in vitro durch T4-Ligase verbunden. Mit der Rekombinanten-DNA wurde der für Tryptophan-Synthese auxotrophe und Rekombinations-defekte E. coli Stamm MV12 transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Tryptophan-freiem

M9s Minimalmedium.

Da der zur Selektion auf Plasmidrekombinanten verwendete Trp-Marker im Gegensatz zu den vorher verwendeten Antibiotikaresistenz Markern einen Test auf den Cop-Phänotyp eines Plasmids nicht erlaubt, wurden von jeweils 4-6 der isolierten Zellklone Klonanalysen durchgeführt. Auf diese Weise wurde die intrazelluläre DNA-Konzentration (bei 25°C und 42°C) der verschiedenen Plasmid-Rekombinanten auf Agarose Gelen miteinander verglichen.

Die Resultate sind schematisch in Abb.8 zusammengefaßt. Sie zeigen, daß die drei Cop-Phänotypen Cop^+, Cop^- und Cop^-_{ts} der in vitro konstruierten Mini-F Rekombinanten nur jeweils in Verbindung mit dem entsprechenden A-Fragment (44.1-45.88 F) der beiden Mutanten und des Wildtyps auftreten. Ein Austausch der B-Fragmente untereinander hat keinen Einfluß auf den Cop-Phänotyp. Anhand dieser Resultate konnten die cop-Mutationen von pJE3021 und von pJE3022 der Mini-F Region von 44.1-45.88 F zugeordnet werden.

Zur weiteren Eingrenzung der cop-Mutationen von pJE3021 und pJE3022 wurden in den folgenden Rekombinationsexperimenten anhand der in Abb.9 veranschaulichten Strategie zuerst das XhoI-PstI Fragment (44.85-45.88 F) und anschließend das 530bp große SmaI-PstI Fragment (45.35-45.88 F) des von pJE3022 abgeleiteten Vektors pJE253 (Cop^-_{ts}) gegen das jeweilig homologe DNA-Fragment des Wildtyps ausgetauscht. Beide Austauschexperimente führten zu einer Veränderung im Phänotyp der analysierten pJE253 Rekombinanten von Cop^-_{ts} nach Cop^+, also zum Cop-Phänotyp des Mini-F Wildtyps.

Die pJE253-Derivate wurden pJE254 (nach Austausch des

X	$Bcop^+$	$Bcop^-$	$Bcop^-_{ts}$
$Acop^+$	Cop^+	Cop^+	Cop^+
$Acop^-$	Cop^-	Cop^-	Cop^-
$Acop^-_{ts}$	Cop^-_{ts}	Cop^-_{ts}	Cop^-_{ts}

Abb.8: Rekombinationsschema mit Cop-Phänotypen nach in vitro Rekombination von verschiedenen Cop-Allelen auf den PstI-Fragmenten A (44.1-45.88 F) und B (45.88-47.3 F) von Mini-F. Die rekombinierten PstI-Fragmente von Mini-F Wildtyp, der Cop-Mutante pJE3021 und der Cop_{ts}-Mutante pJE3022 entsprechen den Symbolen $Acop^+/Bcop^+$, $Acop^-/Bcop^-$ und $Acop^-_{ts}/Bcop^-_{ts}$. Die Cop-Phänotypen (Cop^+, Cop^-, Cop^-_{ts}) der Plasmid-Rekombinanten wurden durch vergleichende Klonanalysen von 25°C- und 42°C-Zellkulturen gleichen Titers bestimmt. Das Rekombinationsschema wird im Text erläutert.

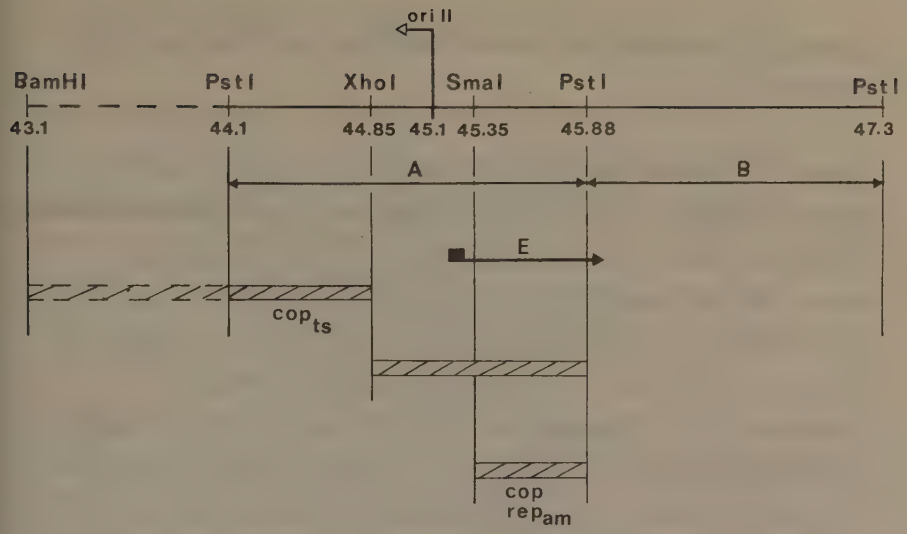


Abb.9: Kartierung der cop- und amber-Mutationen von pJE3021, pJE3022 und pML31am3.
Abbildung 9 zeigt eine Restriktionskarte der Mini-F Sequenz 43.1-47.3 F mit den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen, die zur Kartierung der Mutationen verwendet wurden. Die Kodierungsregion des E-Proteins (E), der Startpunkt der vegetativen Replikation (oriII) und das PstA- und PstB-Fragment sind gekennzeichnet. Für die Kartierungsexperimente wurde der Mini-F Klonierungsvektor pJE253 verwendet. Die Kartierung aller Mutationen erfolgte durch in vitro Rekombination homologer DNA-Fragmente der analysierten Mini-F Mutanten und des Wildtyps (s. schraffierte Querbalken). Die Rekombinationsexperimente werden im Text beschrieben.
1) Die cop-Mutation von pJE3021 und pJE3022 kartiert in dem SmaI-PstI Fragment (45.35-45.88 F). In der gleichen Mini-F Sequenz kartieren die cop-Mutationen der später analysierten Mini-F Derivate pJE276-1 und pJE276-3 (s. 3.8.).
2) Die charakterisierte Rep-amber Mutation von pML31am3 (s. 3.5.) kartiert ebenfalls in der Mini-F Region 45.35-45.88 F.
3) Die cop_{ts}-Mutation von pJE3022 kartiert in der Mini-F Sequenz 44.1-44.85 F.

XhoI-PstI) Fragments und pJE256 (nach Austausch des SmaI-PstI Fragments) genannt.

Unter der Annahme, daß die cop-Mutation von pJE3021 noch im Genom von pJE3022 (bzw. pJE253) vorhanden ist und pJE3022 eine Mehrfachmutante von pJE3021 darstellt, sollten anhand der obigen Versuchsdaten alle cop-Mutationen von pJE3022 innerhalb eines relativ kleinen DNA-Abschnitts von 530 bp (45.35-45.88 F) kartieren. In diesem Fall sollte es möglich sein durch wechselseitigen Austausch des 530 bp großen SmaI-PstI Fragments von Mini-F Wildtyp einerseits und der Kopiezahlmutanten andererseits, jeden der drei definierten Cop-Phänotypen von Mini-F zu erhalten.

Zu Überprüfung dieser Annahme wurden reziproke Austauschexperimente durchgeführt. Zuerst wurde das SmaI-PstI Fragment (45.35--45.88 F) und anschließend das XhoI-PstI Fragment (44.85-45.88F) der pJE253-Rekombinante pJE254 (Cop^+; s.o.) in vitro gegen homologe DNA-Fragmente der Cop-Mutante pJE3021 ausgetauscht. Die erhaltenen und nachfolgend analysierten pJE254 Derivate expremierten jedoch nicht den erwarteten Cop^--Phänotyp von pJE3021, sondern den Cop^-_{ts}-Phänotyp von pJE253 bzw. pJE3022. Dieses Ergebnis widersprach der obigen Annahme bezüglich der gemeinsamen Lage von cop- und cop_{ts}-Mutation von pJE3022 innerhalb der Mini-F Region von 45.35-45.88 F. Die cop_{ts}-Mutation von pJE3022 mußte außerhalb des XhoI-PstI Fragments (44.85-45.88 F) von Mini-F kartieren.

3.4.2. Kartierung der cop_{ts}-Mutation von pJE3022

Die Kartierung der cop_{ts}-Mutation im Genom von pJE3022 (bzw. pJE253) erfolgte durch ein anderes Rekombinationsexperiment. Dabei wurde die bisher noch nicht untersuchte Mini-F Region von pJE253 zwischen den F-Koordinaten 44.1-44.85 F und ein Stück des Tetracyclinresistenz-Gens von pJE253 durch Behandlung der DNA mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und XhoI abgespalten (s. Abb.10). In die entstandene Deletion wurden in vitro die beiden BamHI-XhoI Fragmente von 42.1-43.1 F und 43.1-44.85 F eines Mini-F Wildtyp-Genoms einrekombiniert. Als Spender-DNA für die Wildtyp-Fragmente diente das pBR322:Mini-F Hybrid pJE301 (Wehlmann und Eichenlaub, 1980). Mit der rekombinierten DNA wurde der E. coli Stamm C600 transformiert. Die Transformanten wurden bei 25°C auf TBY-Cm_{40} Medium selektioniert. Das Screening erfolgte auf Bakterienklone mit dem Resistenzphänotyp Cm^r, Tc^s. Zum physikalischen Nachweis der pJE253 Derivate wurden Klonanalysen durchgeführt. Das pJE253-Derivat mit dem 43.1-44.85 F Fragment von Mini-F Wildtyp wurde pLE701 und das zweite Derivat mit der einrekombinierten Wildtyp-Sequenz von 42.1-43.1 F pLE702 benannt (s. Abb.10). Beide pJE253-Derivate bleiben stabil in dem E. coli Stamm C600 erhalten.

Klonanalysen von 25°C-Kulturen zum Vergleich und zur Abschätzung der intrazellulären Plasmidkonzentration von pLE701, pLE702, pJE253 (Cop^-_{ts}) und pJE254 (Cop^+) ermöglichten die Bestimmung des Cop-Phänotyps von pLE701 und pLE702 (s. Abb.11).

Sowohl der Ersatz der Mini-F Region 44.1-44.85 F, als auch

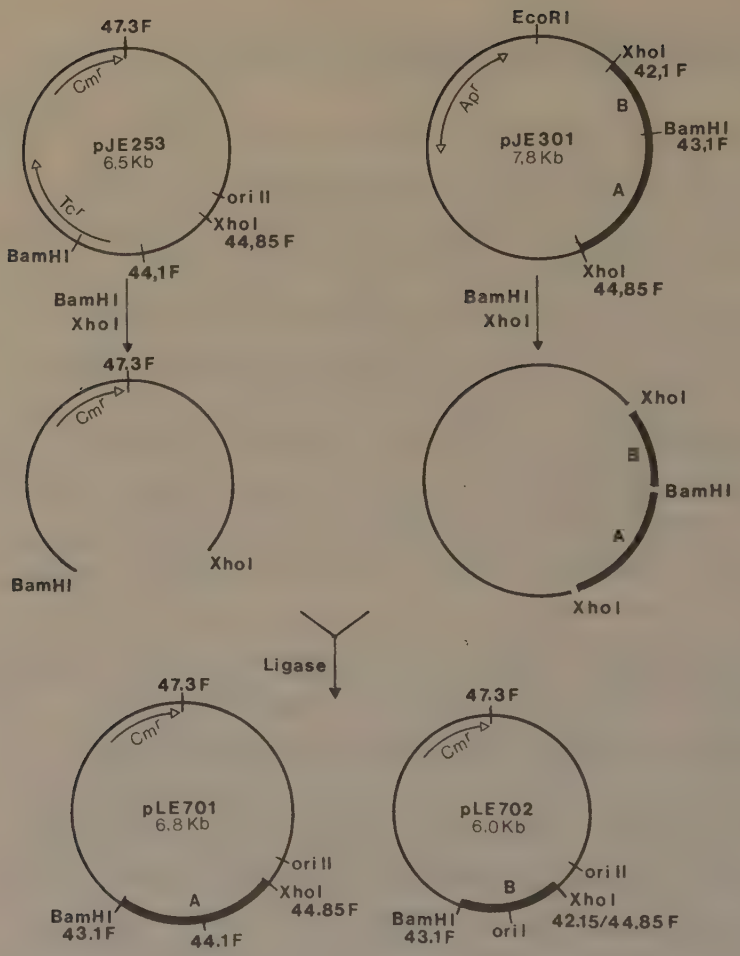


Abb.10: Konstruktion der pJE253 Derivate pLE701 und pLE702. Die DNA von pJE253 wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und XhoI fragmentiert. Anschließend wurde das 1,5 Kb große BamHI-XhoI Fragment von pJE253 mit der Mini-F Sequenz 43.1-44.85 F in vitro durch das BamHI-XhoI Fragment A (43.1-44.85 F)=pLE701 und B (42.1-43.1 F)=pLE702 vom Mini-F Wildtyp ersetzt. Die beiden BamHI-XhoI-Fragmente des Wildtyps wurden aus dem pBR322: Mini-F Hybrid pJE301 (Wehlmann und Eichenlaub, 1980) isoliert.

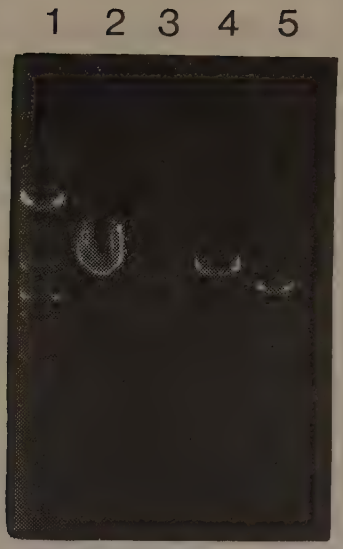


Abb.11: Agarose-Gelelektrophorese zum qualitativen Nachweis des Cop^--Phänotyps der pJE253-Derivate pLE701 und pLE702. Die Plasmid-DNA wurde aus jeweils 1 ml *E. coli*-Zellen (Endtiter 2 x 10^9 Zellen/ml), die bei 25°C in TBY-Cm_{40}-Medium gewachsen waren, isoliert. Jede Plasmid-DNA wurde von der Restriktionsendonuklease EcoRI hydrolysiert. Anschließend wurden die DNA-Präparate auf einem 1% Agarose-Flachgel aufgetrennt.

Spur		Phänotyp
1:	λ-DNA-EcoRI	
2:	pJE253 (6.5 Kb)	(Cop^-_{ts})
3:	pJE254 (6.5 Kb)	(Cop^+)
4:	pLE701 (6.75 Kb)	(Cop^-)
5:	pLE702 (6.0 Kb)	(Cop^-)

die Deletion dieser DNA-Region und die Insertion eines anderen Mini-F Genomabschnitts (42.1-43.1 F) im Fall von pLE702, führt zu einer deutlichen Abnahme der Kopiezahl beider pJE253-Rekombinanten gegenüber dem Elter-Plasmid. Da die aus Klonanalyse-Material isolierten DNA-Mengen von pLE701 und pLE702 aber reproduzierbar größer sind, als die des Vergleichsplasmids pJE254 (Cop^+), kann gefolgert werden, daß die beiden pJE253 Derivate pLE701 und pLE702 einen mit pJE3021 vergleichbaren Cop^--Phänotyp besitzen.

Anhand dieser Versuchsergebnisse kann die Mutation, die den thermosensitiven Kopiezahldefekt des Mini-F Plasmids pJE3022 (bzw. pJE253) induziert, einem Gen-Locus zwischen den F-Koordinaten 44.1-44.85 zugeordnet werden (s. Abb.9). Das Plasmid pLE702 zeigt, daß dieser Gen-Locus fehlen kann, ohne daß die Replikationsfähigkeit des Restmoleküls (44.85-47.3 F) verloren geht. Folgende Schlüsse lassen sich ziehen:
Möglicherweise ist der zwischen 44.1-44.85 F kartierte und mutierte Gen-Locus von pJE3022 für die Replikation von Mini-F nicht essentiell. Dann läßt sich das von Murotsu et al., (1981) auf eine DNA-Region von 44.1-46.35 F reduzierte Basisreplikon von Mini-F um weitere 750 Basenpaare in Richtung auf Origin II (45.1 F) reduzieren.
Oder das Plasmid pLE702 repliziert unter Benutzung des in die BamHI-XhoI Deletion von pJE253 mit dem Wildtyp-Fragment (42.1-43.1 F) einrekombinierten Origins I (42.6 F).
Es ist jedoch auch denkbar, daß das *in vitro* konstruierte Mini-F Hybrid pLE702 mit seinen künstlich zusammengefügten Mini-F Sequenzen (42.1-43.1 F und 44.85-47.3 F) einen

gegenüber dem Wildtyp völlig anders gearteten Replikationsmodus hat.

3.4.3. Charakterisierung der cop_{ts}-Mutation von pJE3022

Das folgende Experiment sollte zeigen, ob die temperaturempfindliche Kopiezahländerung der Mini-F Mehrfachmutante pJE3022 (bzw. pJE253) möglicherweise auf die Ausprägung der cop-Mutation von pJE3021 und eine zweite, thermosensitive rep-Mutation (zwischen 44.1-44.85 F) in der von Eichenlaub (1979) für andere Mini-F Mutanten beschriebenen Weise, zurückgeführt werden kann.
In diesem Fall sollte das pJE253-Derivat pJE254 (s. 3.4.1.) mit der Kopiezahl des Wildtyps und der mutierten DNA-Sequenz 44.1-44.85 F und 45.88-47.3 F der Cop_{ts}-Mutante pJE3022 bei hoher Wuchstemperatur nicht oder nur vermindert replizieren können. Die Folge wäre eine bei 42°C-Bebrütungstemperatur gegenüber einem vergleichbaren Mini-F Wildtyp Plasmid deutlich erhöhte Segregationsrate.

Die Auswertung von Segregationskinetiken, in deren Verlauf die in dem E. coli Stamm C600 enthaltenen Mini-F Plasmide pJE254 und pJE3011 (beide Plasmide sind im Mini-F Teil physikalisch identisch) auf ihre stabile Vererbung bei 42°C Bebrütungstemperatur getestet wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied. Beide Plasmide segregieren pro Zellgeneration mit einer annähernd gleichen Rate von etwa 6 %. Dieser Wert liegt im Bereich anderer Meßwerte, die für Mini-F Plasmide mit defekten oder fehlenden Verteilungsfunktionen erhalten wurden (Ebbers und Eichenlaub, 1981; Austin und Wierzbicki, 1983).

Die zwischen 44.1-44.85 kartierte Mutation von pJE3022, die den Cop^-_{ts}-Phänotyp induziert, scheint sich nur in Verbindung mit der zwischen 45.35-45.88 F lokalisierten cop-Mutation von Mini-F auszuprägen, bzw. sie läßt sich bis jetzt nur in dieser Kombination nachweisen.
Ein in der Mini-F Region 45.35-45.88 F kodiertes Polypeptid als möglicher Träger der cop_{ts}-Mutation von pJE3022 konnte bisher nicht nachgewiesen werden (s. Diskussion).

3.5. Kartierung der amber-Mutation einer Replikations-defekten Mini-F Mutante

Es wurde bereits einleitend erwähnt, daß sich die von Mini-F erhaltenen Mutanten mit Defekten in der Replikationskontrolle aufgliedern lassen in solche mit einer erhöhten Kopiezahl (Cop-Mutanten) und andere mit thermosensitiven oder supprimierbaren Defekten bei der Initiation der Replikation (Rep-Mutanten).
Die Charakterisierung einer von Eichenlaub und Wehlmann (1980) isolierten Replikations-defekten amber-Mutante von Mini-F mit der Bezeichnung pML31am3 hatte ergeben, daß diese Mutante neben einer amber-Mutation im C-Protein (die eine Initiation der Replikation im Origin I blockiert) noch eine zweite amber-Mutation im Genom enthalten muß (s. Einleitung). Der mutierte Gen-Locus ließ sich der Mini-F Region 43.1-49.3 F zuordnen. Die defekte Replikationsfunktion selbst konnte jedoch nicht identifiziert werden.
Von der Überlegung ausgehend, daß Determinanten der Replikations- und Kopiezahlkontrolle von Mini-F möglicherweise interagieren oder identisch sind, wurde der Versuch unternommen,

die zweite amber-Mutation von pML31*am3* zu kartieren. Die Kartierungsergebnisse sollten mit denen von Kopiezahlmutanten verglichen und falls möglich, konkreten Funktionen zugeordnet werden.

Die Kartierung der zweiten amber-Mutation von pML31*am3* erfolgte mit Hilfe des Mini-F Vektors pJE253, wobei der schon für die Kartierung der cop-Mutationen von pJE3021 und pJE3022 verwendeten Strategie gefolgt wurde (s. Abb.9).
Die nach *in vitro* Austausch des *Xho*I-*Pst*I-Fragments (44.85-45.88 F) und *Sma*I-*Pst*-Fragments (45.35-45.88 F) von pJE253 gegen homologe DNA-Fragmente der amber-Mutante isolierten und analysierten pJE253-Rekombinanten besaßen alle den Rep-amber Phänotyp von pML31*am3*.
Sie konnten nur bei niedriger Bebrütungstemperatur (25°C) in der für einen thermosensitiven Suppressor kodierenden *E. coli* Mutante RH2358 replizieren (unter Selektionsdruck kein Wuchs der Bakterienwirte bei 42°C Inkubationstemperatur).

Zum Nachweis der bei 42°C Inkubationstemperatur blockierten Replikation der isolierten pJE253-Rekombinanten wurden mehrere Zellklone für 10 Generationen ohne Selektionsdruck parallel bei 25°C und 42°C bis zur stationären Phase kultiviert und anschließend die Plasmid-DNA präpariert. Nachdem das Klonanalyse Material auf analytischen Agarose-Gelen aufgetrennt worden war, konnte aus 42°C-Zellkulturen keine Plasmid-DNA nachgewiesen werden (s. Abb.12). Die pJE253 Rekombinanten pJE274, pJE274-1 und pJE274-2 waren bei 42°C Inkubationstemperatur (su^- Bedingungen) segregiert.

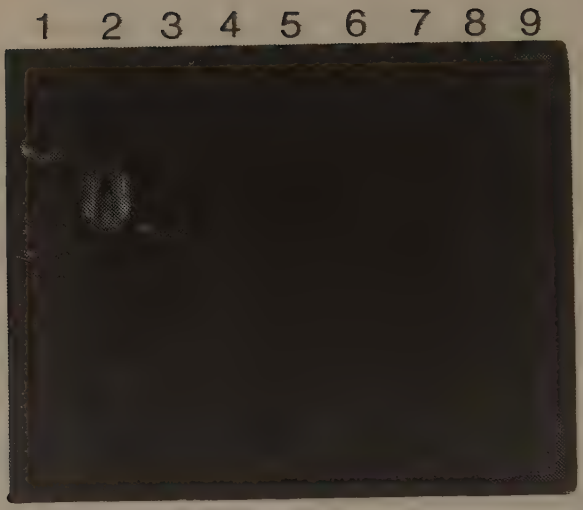


Abb.12: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis des Rep-amber Phänotyps der drei pJE253-Rekombinanten pJE274, pJE274-1 und pJE274-2.
Die Plasmid-DNA von pJE253 und der drei pJE253 Derivate wurde aus TBY-Kulturen der *E. coli* Mutante RH2358$supF_{ts}$ isoliert, die bei 25°C und bei 42°C bis zu einem Titer von 1 x 10^9 Zellen/ml gewachsen waren. Die Plasmid-DNA wurde durch die Restriktionsendonuklease PstI hydrolysiert und auf einem 1% Agarose-Flachgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Spur 1: λ-DNA-EcoRI

2: pJE253 (25°C)	6: pJE274-1 (25°C)
3: pJE253 (42°C)	7: pJE274-1 (42°C)
4: pJE274 (25°C)	8: pJE274-2 (25°C)
5: pJE274 (42°C)	9: pJE274-2 (42°C)

Von den amber-Mutanten pJE274, pJE274-1 und pJE274-2 kann aus 42°C-Kulturen keine Plasmid-DNA nachgewiesen werden (s. Spur 5, 7, 9). Die Plasmide segregieren unter su^- Bedingungen.

Anhand der obigen Rekombinationsexperimente konnte die zweite amber-Mutation von pM131am3, ebenso wie die zuvor kartierte cop-Mutation von pJE3021 bzw. pJE3022, dem Genomabschnitt zwischen den F-Koordinaten 45.35-45.88 zugeordnet werden. In diesem Genomabschnitt wird das E-Protein von Mini-F transkribiert (s. Abb.9). Es konnte angenommen werden, daß sich die untersuchten cop- und amber-Mutationen im Gen-Locus des E-Proteins befinden. Die Kartierung dieser Mutationen in einem DNA-Abschnitt von nur 530 Basenpaaren machte eine Feinkartierung durch Sequenzanalysen möglich.

3.6. Feinkartierung der cop- und amber-Mutationen von Mini-F Plasmiden durch DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung des SmaI-PstI-Fragments (45.35-45.88 F) von Mini-F Wildtyp pSC138, der Cop-Mutante pJE3021 und der Cop_{ts}-Mutante pJE3022, sowie der amber-Mutante pM131am3 erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger et al., (1977). Hierfür wurde die Plasmid-DNA vom Wildtyp und der drei Mutanten durch die Restriktionsendonukleasen SmaI und PstI hydrolysiert. Die 530 bp großen SmaI-PstI Fragmente (45.35-45.88 F) wurden präparativ isoliert, in vitro in die komplementäre SmaI-PstI Schnittöffnung der Bakteriophagen DNA und von M13mp8 und M13mp9 (Messing und Vieira, 1982) inseriert und anschließend sequenziert.

Abbildung 13 zeigt die Wildtyp-Sequenz vom Strukturgen des E-Proteins von Mini-F zwischen den Koordinaten 45.252-46.004 F (Murotsu et al., 1981; Ebbers et al., in Vorbereitung) mit der ableitbaren Aminosäuresequenz.

```
    1
    Met Ala Glu Thr Ala Val Ile Asn His Lys Lys Arg Lys Asn Ser Pro Arg
5'- ATG GCG GAA ACA GCG GTT ATC AAT CAC AAG AAA CGT AAA AAT AGC CCG CGA - 3'

    Ile Val Gln Ser Asn Asp Leu Thr Glu Ala Ala Tyr Ser Leu Ser Arg Asp
5'- ATC GTC CAG TCA AAC GAC CTC ACT GAG GCG GCA TAT AGT CTC TCC CGG GAT - 3'
                                                        SmaI

    Gln Lys Arg Met Leu Tyr Leu Phe Val Asp Gln Ile Arg Lys Ser Asp Gly
5'- CAA AAA CGT ATG CTG TAT CTG TTC GTT GAC CAG ATC AGA AAA TCT GAT GGC - 3'

        160
    Thr Leu Gln Glu His Asp Gly Ile Cys Glu Ile His Val Ala Lys Tyr Ala
5'- ACC CTA CAG GAA CAT GAC GGT ATC TGC GAG ATC CAT GTT GCT AAA TAT GCT - 3'
           TAG
           am

    Glu Ile Phe Gly Leu Thr Ser Ala Glu Ala Ser Lys Asp Ile Arg Gln Ala
5'- GAA ATA TTC GGA TTG ACC TCT GCG GAA GCC AGT AAG GAT ATA CGG CAG GCA - 3'
                                                        305 308
    Leu Lys Ser Phe Ala Gly Lys Glu Val Val Phe Tyr Arg Pro Glu Glu Asp
5'- TTG AAG AGT TTC GCG GGG AAG GAA GTG GTT TTT TAT CGC CCT GAA GAG GAT - 3'
                                                              AAG AAT
                                                              Lys Asn
                                                              cop cop
    Ala Gly Asp Glu Lys Gly Tyr Glu Ser Phe Pro Trp Phe Ile Lys Arg Ala
5'- GCC GGC GAT GAA AAA GGC TAT GAA TCT TTT CCT TGG TTT ATC AAA CGT GCG - 3'
    359                                     387
    His Ser Pro Ser Arg Gly Leu Tyr Ser Val His Ile Asn Pro Tyr Leu Ile
5'- CAC AGT CCA TCC AGA GGG CTT TAC AGT GTA CAT ATC AAC CCA TAT CTC ATT - 3'
    CAT                                     TAT
    His                                     Tyr
                                            cop

    Pro Phe Phe Ile Gly Leu Gln Asn Arg Phe Thr Gln Phe Arg Leu Ser Glu
5'- CCC TTC TTT ATC GGG TTA CAG AAC CGG TTT ACG CAG TTT CGG CTT AGT GAA - 3'

    Thr Lys Glu Ile Thr Asn Pro Tyr Ala Met Arg Leu Tyr Glu Ser Leu Cys
5'- ACA AAA GAA ATC ACC AAT CCG TAT GCC ATG CGT TTA TAC GAA TCC CTG TGT - 3'

    Gln Tyr Arg Lys Pro Asp Gly Ser Gly Ile Val Ser Leu Lys Ile Asp Trp
5'- CAG TAT CGT AAG CCG GAT GGC TCA GGC ATC GTC TCT CTG AAA ATC GAC TGG - 3'

    Ile Ile Glu Arg Tyr Gln Leu Pro Gln Ser Tyr Gln Arg Met Pro Asp Phe
5'- ATC ATA GAG CGT TAC CAG CTC CCT CAA AGT TAC CAG CGT ATG CCT GAC TTC - 3'

    Arg Arg Arg Phe Leu Gln Val Cys Val Asn Glu Ile Tyr Ser Arg Thr Pro
5'- CGC CGC CGC TTC CTG CAG GTC TGT GTT AAT GAG ATC TAC AGC AGA ACT CCA - 3'
                    PstI
    Met Arg Leu Ser Tyr Ile Glu Lys Lys Lys Gly Arg Gln Thr Thr His Ile
5'- ATG CGC CTC TCA TAC ATT GAG AAA AAG AAA GGC CGC CAG ACG ACT CAT ATC - 3'

    Val Phe Ser Phe Arg Asp Ile Thr Ser Met Thr Thr Gly
5'- GTA TTT TCC TTC CGC GAT ATC ACT TCC ATG ACG ACA GGA TAG              - 3'
```

Abb.13: DNA-Sequenz des E-Proteins von Mini-F (45.252-46.004 F) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen SmaI (45.35 F) und PstI (45.88 F) sind unterstrichen.
Die Positionen der kartierten cop- und amber-Mutationen sind eingerahmt. Einzelheiten zur DNA-Sequenz sind im Text erläutert.

Das erste Nukleotid im Startcodon des Strukturgens ist als Position 1 definiert. Die Schnittsequenzen der Restriktionsendonukleasen SmaI (45.35 F) und PstI (45.88 F) und die innerhalb der Mini-F Koordinaten 45.35-45.88 F kartierten Transitionsmutationen der drei sequenzierten Mini-F Mutanten sind kenntlich gemacht.
Die cop-Mutation von pJE3021 bzw. pJE3022 kartiert in Position 305 der Nukleotidsequenz und führt zu einem Austausch in der Aminosäuresequenz von Glutaminsäure nach Lysin. Eine bei der thermosensitiven Kopiezahlmutante pJE3022 zusätzlich vorgefundene Transition in Position 359 der DNA-Sequenz hat keine Veränderung der Aminosäure zur Folge (CAC→CAG, His→His) und kann sich daher phänotypisch nicht auswirken (stille Mutation).

Das TAG-Triplett der amber-Mutante pML31am3 (als Folge einer Transitionsmutation in Position 160 der Nukleotidsequenz) führt zu einem Abbruch der Proteinsynthese in Position 54 der Aminosäuresequenz. Eine Restaktivität des verbliebenen Polypeptids kann ausgeschlossen werden.
An dieser Stelle sei vorweggenommen, daß noch zwei weitere Transitions-Mutationen im Strukturgen des E-Proteins kartiert werden konnten (in Position 308 und 387 der Nukleotidsequenz). Beide Mutationen bewirken eine Kopiezahlerhöhung der von pML31am3 abgeleiteten Mini-F Rep-amber Mutanten pJE276-1 und pJE276-3 (s. 3.8.).

Die unterschiedliche Beeinflussung der Mini-F Replikation durch eine cop- oder amber-Mutation im E-Protein zeigt, daß dieses Protein eine zentrale Funktion bei der Initiation der Replikation und in der Kopiezahlkontrolle dieses Plasmids

haben muß.

Obwohl die Kopiezahlerhöhung von Mini-F Plasmiden mit einer cop-Mutation im E-Protein auf eine Repressorfunktion dieses Proteins für die Initiation der Replikation hindeutet, muß dieses Protein ein positives Kontrollelement (Initiator) der Mini-F Replikation sein. Ansonsten wäre der beobachtete Replikationsdefekt von Mini-F Plasmiden mit einer amber-Mutation im E-Protein in einem Suppressor-negativen Milieu nicht verständlich. Die mögliche Funktionsweise des E-Proteins von Mini-F wird nachfolgend diskutiert werden.

3.7. Komplementation der thermosensitiven Mini-F Kopiezahlmutante pJE253

Die im Rahmen von Inkompatibilitäts-Studien erstellten Segregationskinetiken von Wildtyp Plasmiden und Kopiezahlmutanten von Mini-F hatten entgegen der Erwartung eine symmetrische Auftrennung (Segregation) beider Plasmide auf die nachfolgenden Zellgenerationen erkennen lassen (s. 3.2.). Diese Beobachtung hatte zur Annahme geführt, daß sich die Kopiezahl von Mini-F Wildtyp und der Mutanten möglicherweise durch *in trans* aktive Funktionen der Kopiezahlkontrolle verändert und eventuell angleicht.

Nachdem das E-Protein von Mini-F als eine Funktion der Kopiezahlkontrolle identifiziert werden konnte, stellt sich die Frage, welche Auswirkung die simultane Expression des E-Proteins vom Wildtyp und einer Cop_{ts}-Mutante unter Komplementationsbedingungen auf die Kopiezahlregulation beider Mini-F Replikons hat.

Die Inkompatibilität von Plasmiden hat sich als ein großes Hindernis für Komplementations-Experimente mit zwei autonom replizierenden Plasmiden erwiesen. Unter diesen Bedingungen sind keine gesicherten Versuchsergebnisse zu erhalten. Daher sollte die Inkompatibilitätsbarriere durch die in vitro Konstruktion eines Mini-F Kointegrates umgangen werden. Die Verwendung des E. coli recA-Stammes MV12 als Bakterienwirt für das in vitro konstruierte Mini-F Hybrid sollte weitere in vivo Rekombinationen dieses Plasmids verhindern.
Der Mini-F Vektor pJE253 enthält außerhalb seiner Mini-F Sequenz mehrere Einzelschnittstellen von Restriktionsendonukleasen, in die DNA integriert werden kann (s. Abb.7). Daher ist dieses Plasmid für die Konstruktion eines Mini-F Hybrids, in dem zwei verschiedene Cop-Genotypen verbunden sein sollen, geeignet.

Für die Integration eines Mini-F Wildtyp-Genoms in die EcoRI-Schnittstelle von pJE253 (s. Abb.7) wurde die Plasmid-DNA von pJE253 (Cop^-_{ts}) und pSC138 (Cop^+) durch die Restriktionsendonuklease EcoRI hydrolysiert, die Ansätze wurden vereinigt und die DNA-Moleküle in vitro neukombiniert. Weil nach Insertion von DNA in die EcoRI-Schnittstelle von pJE253 das Chloramphenicolresistenz-Gen inaktiviert wird, erfolgte das Screening der transformierten Bakterien auf Klone mit dem Phänotyp Tc^r, Cm^s und auf Pen^s zur Gegenselektion auf pJE253-Derivate die den Ap-Marker Teil von pSC138 integriert haben.

Ein Test, für den 10 der selektionierten Klone auf TBY-Medium mit hoher Tetracyclinkonzentration ($TBY\text{-}Tc_{18}$) überimpft und bei 25°C bebrütet wurden, zeigte, daß sich die Kopiezahl von

pJE253 nach Insertion der Mini-F Wildtyp-DNA vermindert haben muß. Keiner der überimpften Wirtsklone konnte unter diesen Selektionsbedingungen wachsen.
Eine Klonanalyse ergab, daß alle 10 getesteten Klone das gleiche pJE253:Mini-F Wildtyp Plasmid enthielten. Eines dieser Kointegrate mit der Bezeichnung pJE257 (s. Abb.14) wurde für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.
Vergleichende Klonanalysen von 25°C-Zellkulturen zur Abschätzung der intrazellulären Kopiezahl von pJE257 im Bezug auf die beiden Elter-Plasmide pJE253 (Cop^-_{ts}) und pSC138 (Cop^+) zeigen, daß die Kopiezahl des Mini-F Kointegrates auf das Niveau des Wildtyps abgesunken ist (s. Abb.14).
Die Kopiezahl von pJE257 scheint jedoch nicht völlig mit der eines Wildtyp Replikons übereinzustimmen, da bei vergleichenden Kopiezahlmessungen für das Plasmid pJE257 eine durchschnittliche Zahl von etwa 4 Kopien pro Zelle ermittelt wurde (s. Tabelle 3).
Eine deutliche Änderung der Kopiezahl von pJE257 bei 25°C und 42°C Inkubationstemperatur trat nicht auf. Die zwischen 44.1-44.85 F kartierte cop_{ts}-Mutation von pJE253 kann sich also unter Komplementationsbedingungen ebenfalls nicht ausprägen.

Zur Überprüfung, ob die cop- und cop_{ts}-Mutation von pJE253 noch im Genom des Mini-F Kointegrates pJE257 vorhanden ist, wurde die Mini-F Wildtyp-DNA dieses Plasmids mit der Restriktionsendonuklease EcoRI abgespalten. Die *in vitro* rezirkularisierten und in nachfolgenden Klonanalysen untersuchten Deletionsderivate von pJE257 besaßen alle den Cop^-_{ts}-Phänotyp von pJE253. Das Plasmid pJE257 enthält also zwei funktionierende Mini-F Replikons, von denen das cop-Allel

Abb.14 a

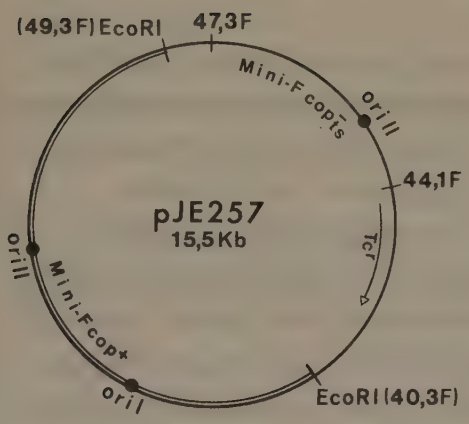


Abb.14 b

Abb.14a: Physikalische Karte des Mini-F Kointegrates pJE257 (Cop^+). Die DNA von Mini-F Wildtyp (pSC138) ist in die EcoRI-Schnittstelle von pJE253 integriert.

Abb.14b: Agarose-Gelelektrophorese zum Vergleich der intrazellulären Plasmidkonzentration von pSC138 (Cop^+), pJE253 (Cop^-_{ts}) und des Mini-F Kointegrates pJE257 bei 25°C Inkubationstemperatur. Die Plasmid-DNA wurde aus jeweils 2 ml TBY-Kulturen (Zelltiter 2 x 10^9/ml) des *E. coli recA*-Stammes MV12 isoliert. Die Plasmid-DNA wurde durch die Restriktionsendonuklease EcoRI hydrolysiert und auf einem 1% Agarose-Flachgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Spur 1: λ-DNA-EcoRI
2: pSC138 (9 Kb, 7.2 Kb)
3: pJE257 (9 Kb, 6.5 Kb)
4: pJE253 (6.5 Kb)

Das Plasmid pJE257 wurde nur partiell geschnitten; die 15.5 Kb DNA-Bande in Spur 3 ist linearisierte pJE257 DNA.

des Wildtyps in der Kopiezahlkontrolle über das cop-Allel der Mutante dominant ist.

Da zuvor gezeigt werden konnte, daß das E-Protein von Mini-F für die Initiation der Replikation und Kopiezahlkontrolle dieses Plasmids benötigt wird, läßt sich postulieren, daß das E-Protein vom Wildtyp in trans aktiv ist und unter Komplementationsbedingungen in seiner Funktion gegenüber dem mutierten E-Protein dominant ist. Diese Annahme konnte mit der Betrachtung des Cop-Phänotyps eines anderen parallel zu pJE257 konstruierten Mini-F Kointegrates mit der Bezeichnung pRE502 bestätigt werden (Eichenlaub, pers. Mitteilung).

Zur Konstruktion von pRE502 wurde in die EcoRI Schnittstelle von pJE253 an Stelle der Mini-F DNA von pSC138 die Mini-F DNA der Replikationsmutante pML31am3Δ40.4-43.1 F (amber-Mutation im E-Protein) integriert. Anschließend wurde die Kopiezahl von pRE502 bei 25°C Wuchstemperatur in dem supprimierenden E. coli Stamm RH2358supF_{ts} und in dem Suppressor-negativen E. coli Stamm W3550su$^-$ überprüft. Es konnte gezeigt werden, daß sich die cop-Mutationen von pJE253 in dem Mini-F Kointegrat pRE502 nur ausprägen können, wenn das E-Protein der Mini-F amber-Mutante in dem Suppressor-negativen Stamm W3550 nicht synthetisiert wird. Unter supprimierenden Bedingungen (bei 25°C in E. coli RH2358) hat das Mini-F Hybrid pRE502 eine dem Plasmid pJE257 gleiche und niedrige Kopiezahl.

Die erhaltenen Versuchsdaten erklären das im Rahmen von Inkompatibilitäts-Studien bei Mini-F Kopiezahlmutanten und

Wildtyp Plasmiden beachtete symmetrische Segregationsverhalten (s. 3.2.3.). Das intakte E-Protein des Wildtyp Plasmids reduziert unter Inkompatibilitätsbedingungen die Kopiezahl der Mini-F Mutante auf das Wildtypniveau. Durch diese Kopiezahlangleichung werden beide Plasmide mit gleich großer Wahrschinlichkeit (symmetrisch) auf die Tochterzellen einer wachsenden Zellkultur verteilt.

3.8. Isolation und Charakterisierung von supprimierbaren Mini-F Vektoren mit thermosensitiver Kopiezahl

Der Mini-F Vektor pJE253 und die von diesem Plasmid abgeleiteten Cosmid-Vektoren besitzen die wesentlichen Merkmale eines Klonierungsvektors (s. Problemstellung). Es fehlt jedoch eine Eigenschaft, die ein Mini-F Vektor haben sollte, nämlich eine extrem niedrige Kopiezahl. Mit etwa 6 Kopien pro Zelle bei 42°C Inkubationstemperatur (s. Tabelle 3) repliziert pJE253 mit einer gegenüber dem Wildtyp 4 fach erhöhten Rate. Daher ist eine Expression von in diesem Vektor inserierten Genen auf möglichst niedrigem Niveau nicht realisierbar. Zumal die für eine deutliche Verminderung der Kopiezahl von pJE253 erforderliche Wuchstemperatur von etwa 42°C mit ihrer nachteiligen Auswirkung auf den Metabolismus von E. coli Bakterien solche Experimente zusätzlich erschweren dürfte.

Zuvor konnte gezeigt werden, daß pJE253-Rekombinanten mit einer amber-Mutation im E-Protein nur unter supprimierenden Bedingungen bei Temperaturen um 25°C in der E. coli Mutante RH2358$supF_{ts}$ replizieren können (s. 3.5.).

Mit ansteigender Wuchstemperatur wird die Replikation zunehmend inhibiert und die Kopiezahl dieser Mutanten sinkt unter das Wildtypniveau.
Durch die Kombination einer cop- und amber-Mutation im E-Protein von Mini-F mit ihrer entgegengerichteten Wirkung auf die Mini-F Replikation sollte es theoretisch möglich sein, einen gegenüber pJE253 verbesserten Mini-F Cop^-_{ts}-Vektor zu erhalten, dessen Kopiezahl in dem E. coli Stamm RH2358 mit der Wuchstemperatur bis auf das Wildtypniveau reduziert werden kann.

Ausgegangen wurde von einer Rekombinante des Mini-F Vektors pJE253 mit dem Genotyp rep_{am},cop^+. Dieses Plasmid mit der Bezeichnung pJE274 war nach Austausch des SmaI-PstI Fragments (45.35-45.88 F) von pJE253 gegen das homologe DNA Fragment der Mini-F amber-Mutante pML31am3 isoliert und charakterisiert worden (s. 3.5.).
Zur Einführung von cop-Mutationen in das Genom von pJE274 wurden 0,5 µg gereinigte pJE274-DNA mit Hydroxylamin behandelt (20 min, 70°C) und der E. coli Stamm RH2358 mit der mutagenisierten Plasmid DNA transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf TBY-Tc_{18} Medium bei 25°C Inkubationstemperatur. Unter diesen Selektionsbedingungen sollten nur Klone wachsen können, die Kopiezahlmutanten von pJE274 inkorporiert haben.
Es konnten 22 Zellklone isoliert werden, die nur bei 25°C, jedoch nicht bei 42°C auf TBY-Tc_{18} Medium wachsen konnten, die also die phänotypischen Merkmale temperaturabhängiger Kopiezahlmutanten von pJE274 besaßen. Im Rahmen der folgenden Klonanalyse konnten 8 Kopiezahlmutanten von pJE274 isoliert

werden, von denen zwei mit der Bezeichnung pJE276-1 und pJE276-3 für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt wurden.

Vergleichende Klonanalysen und parallel dazu durchgeführte Kopiezahlbestimmungen mit radioaktiv markierter Plasmid DNA machten die Temperaturabhängigkeit der Kopiezahl von pJE276-1 und pJE276-3 in dem E. coli Stamm RH358 deutlich. Die erhaltenen Untersuchungsergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:
Die intrazelluläre Kopiezahl der beiden Mini-F Vektoren nimmt von 50-60 Kopien bei 25°C auf etwa 3 Kopien bei 38°C ab (s. Tabelle 3 und Abb. 15). Die für pJE276-1 und pJE276-3 erstellten Segregationskinetiken zeigen, daß beide Plasmide bis zu einer Wuchstemperatur von 38°C noch stabil in ihren Wirtsbakterien erhalten bleiben. Eine weitere Erhöhung der Bebrütungstemperatur auf 42°C (su^- Bedingungen) führt zu einer beschleunigten Segregation beider Plasmide, so daß nach 10 Zellgenerationen bei 42°C nur noch etwa 0,5% der Zellen einer Kultur die Marker Gene von pJE276-1 oder pJE276-3 expremieren. Plasmid-DNA aus diesen Zellkulturen kann auf Agarose Gelen nicht mehr nachgewiesen werden (s. Abb.15).

Zum physikalischen Nachweis und zur Feinkartierung der cop-Mutationen von pJE276-1 und pJE276-3 wurde die Mini-F Sequenz von 45.35-45.88 F beider Plasmide in der oben beschriebenen Weise analysiert (s. 3.6.). Ebenso wie bei den zuvor untersuchten Mini-F Cop-Mutanten kartieren die cop-Mutationen von pJE276-1 und pJE276-3 im Strukturgen des E-Proteins von Mini-F und zwar in der Nähe der cop-Mutation von pJE3021 bzw. pJE3022

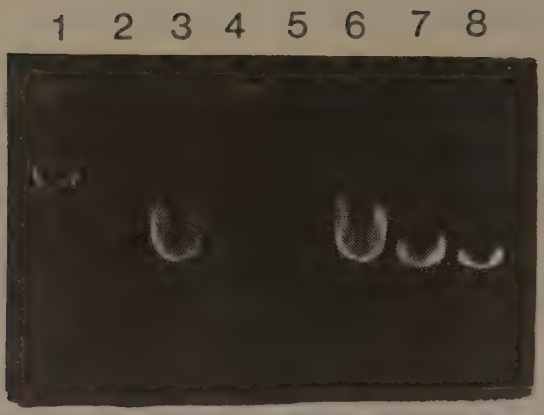


Abb.15: Agarose-Gelelektrophorese zum qualitativen Nachweis der Kopiezahlverminderung von pJE276-1 und pJE253 bei steigender Inkubationstemperatur. Als Kontrolle diente Plasmid-DNA von pJE254 (cop^+) aus einer 25°C-Kultur. Die Plasmid-DNA wurde aus 25°C, 38°C und 42°C Zellkulturen der E. coli Stämme C600 (Bakterienwirt von pJE254 und pJE253) und RH2358$supF_{ts}$ (Bakterienwirt von pJE276-1) isoliert. Jede Zellkultur wurde in TBY-Medium bis zu einem Titer von 2 x 10^9 Zellen/ml inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde durch die Restriktionsendonuklease EcoRI hydrolysiert und auf einem 1% Agarose-Flachgel aufgetrennt.

1: λ-DNA-EcoRI 2: pJE254 (25°C)
3: pJE276-1 (25°C) 4: pJE276-1 (38°C) 5: pJE276-1 (42°C)
6: pJE253 (25°C) 7: pJE253 (38°C) 8: pJE253 (42°C)

Ein Vergleich der aufgetrennten Plasmid-Isolate aus 25°C, 38°C und 42°C Kulturen zeigt, daß die intrazelluläre Kopiezahl der Mini-F Vektoren pJE276-1 und pJE253 mit steigender Wuchstemperatur abnimmt. Der Vektor pJE276-1 scheint bei 38°C Inkubationstemperatur eine dem Mini-F Wildtyp (pJE254) entsprechende Kopiezahl zu haben (s. Spur 2 und 4). In Spur 5 kann keine Plasmid-DNA nachgewiesen werden, pJE276-1 segregiert unter su^--Bedingungen (42°C).

(s. Abb.13). Die Transitionsmutation in Position 308 der Nukleotid-Sequenz von pJE276-1 führt zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure nach Asparagin. Die Punktmutation im Genom von pJE276-3 in Position 387 bewirkt einen Austausch von Histidin nach Tyrosin.

Mit den beiden Mini-F Vektoren pJE276-1 und pJE276-3 kann eine Lücke (im Anwendungsbereich) zwischen dem Cop^-_{ts}-Vektor pJE253 und den von Mini-F Wildtyp Plasmiden abstammenden Plasmidvektoren mit ausschließlich niedriger Kopiezahl geschlossen werden (Eichenlaub und Ebbers, in Vorbereitung). Die pJE276 Vektoren vereinigen die Vorteile von Klonierungsvektoren mit hoher Kopiezahl (z.B. hohe DNA-Ausbeuten) mit den Vorteilen von Vektoren mit niedriger Kopiezahl, d.h. die Möglichkeit einer Expression von klonierten Genen auf einem Minimalniveau (bei 38°C-Bebrütungstemperatur).
Wahrscheinlich lassen sich diese Mini-F Vektoren auch als Sicherheitsvektoren verwenden, da pJE276-1 und pJE276-3 aufgrund der amber-Mutation im Gen-Locus des E-Proteins nur in supprimierenden E. coli Stämmen, wie z.B. RH2358, replizieren können.

4.0. Diskussion

Die Replikation von Plasmid-DNA ist ein sorgfältig regulierter Vorgang im Zellzyklus eines Bakteriums. Dies führt dazu, daß in einer exponentiell wachsenden Zellkultur die Menge an Plasmid-DNA kontinuierlich mit der Zellzahl ansteigt, so daß für jedes Plasmid eine definierte intrazelluläre Kopiezahl ermittelt werden kann.

Während die Kopiezahl einiger Plasmide nur durch chromosomale Funktionen reguliert zu werden scheint, konnten bei den Plasmiden R1drd-19 (Nordström et al., 1972), NR1 (Morris et al., 1974) und ColE1 (Gelfand et al., 1978) Mutationen im Plasmidgenom nachgewiesen werden, die eine Kopiezahlerhöhung dieser Plasmide bewirken. Im Falle des F-Faktors bzw. Mini-F konnten sowohl chromosomale als auch plasmidspezifische Mutationen nachgewiesen werden (Cress und Kline, 1976; Manis und Kline, 1978), die eine Kopiezahlveränderung dieser Plasmide zur Folge haben.

Es blieb jedoch ungeklärt, auf welche Weise die Kopiezahl der obengenannten Plasmide reguliert wird und welche plasmidspezifischen Funktionen an diesem Regulationsvorgang beteiligt sind.

Zur Beantwortung dieser Fragen hat man vor einigen Jahren damit begonnen, von Mini-Derivaten der Plasmide ColE1, R1drd-19, R6-5 und von Mini-F Kopiezahlmutanten zu isolieren. Das Studium dieser Kopiezahlmutanten ermöglichte die Identifizierung von Genen und deren Produkte, die eine Funktion in der Kopiezahlregulation dieser Plasmide haben.

4.1. Die Isolation und Charakterisierung von Kopiezahlmutanten des Plasmids Mini-F

Zur Kartierung und Charakterisierung der Mini-F spezifischen Determinanten für Replikation und Kopiezahlkontrolle wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden gewählt,um Mutationen in das Genom einzuführen. Neben der *in vivo* Mutagenese durch Nitrosoguanidin oder Ethylenmethansulfonat (Manis und Kline, 1978; Ely und Staudenbauer, 1981) wurden zahlreiche Mini-F Mutanten auch durch *in vivo* Insertionen des Transposons Tn3 erzeugt (Manis und Kline, 1978; Bergquist et al., 1981). Anhand von *in vitro* Rekombinationsexperimenten mit chemisch induzierten Kopiezahlmutanten konnten Manis und Kline (1978) die Gen-Loci der Kopiezahlkontrolle von Mini-F in der DNA-Region von 43.1-46.4 F lokalisieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß eine Insertion des Transposons Tn3 in den *incB*-(45.1-45.8 F) oder *incC*-Locus (45.8-46.9 F) von Mini-F eine Erhöhung der Kopiezahl dieser Mutanten zur Folge hat (Manis und Kline, 1978; Bergquist et al., 1981). Anhand dieser Befunde wurde dem *incB* und *incC*-Locus von Mini-F eine Funktion in der Kopiezahlkontrolle zugeschrieben.
Ob diese Gen-Loci für Proteine kodieren, oder als Erkennungssequenzen für Proteine dienen war ebenso ungeklärt wie die Frage, welches der von Mini-F zwischen 43.1-46.4 F kodierten Proteine eine Funktion in der Kopiezahlkontrolle dieses Plasmids haben könnte.

In unserem Labor konnten nach *in vitro* Mutagenese mit Hydroxylamin schon erfolgreich konditionale Replikationsmutanten von Mini-F isoliert und charakterisiert werden (Eichenlaub, 1979; Wehlmann und Eichenlaub, 1980). Unter Verwendung der

gleichen Mutagenesetechnik wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit damit begonnen, Kopiezahlmutanten bzw. konditionale Kopiezahlmutanten von Mini-F zu isolieren, um nachfolgend die Determinanten der Kopiezahlkontrolle von Mini-F charakterisieren zu können.
In dem Zeitraum, in dem diese Untersuchungen durchgeführt wurden, konnten von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls Kopiezahlmutanten von Mini-F isoliert und beschrieben werden. Es besteht daher die Möglichkeit, die auf unterschiedlichen methodischen Wegen erhaltenen Versuchsergebnisse zu vergleichen und zu diskutieren.

Um die mit Hydroxylamin induzierten Punktmutationen bei Kopiezahlmutanten von Mini-F schnell und präzise kartieren zu können, wurde neben dem kompletten Mini-F Genom (pSC138) das auf die Mini-F Region 44.1-47.3 F reduzierte und dem Basis-Replikon von Mini-F (44.1-46.35 F) ähnliche Plasmid pJE3011 für die Mutagenese Experimente ausgewählt. Mit dieser Begrenzung des Mini-F Replikons auf eine Größe von 3.2 Kb konnten natürlich eventuelle Cop-Funktionen des Wildtyps, die außerhalb der Mini-F Region 44.1-47.3 F kartieren, nicht mehr mutagenisiert und nachfolgend identifiziert werden.
Darum wurden alle durchgeführten Mutagenese Schritte parallel mit den Mini-F Plasmiden pSC138 und pJE3011 durchgeführt. Nach der Kartierung von cop-Mutationen in pJE3011-Derivaten sollte es möglich sein, die Kopiezahlmutanten von pSC138 zu einem späteren Zeitpunkt schneller zu analysieren und eventuelle Unterschiede zu den pJE3011-Mutanten aufzeigen zu können.

Die Kartierung von chemisch induzierten Punktmutationen in

einem Genom ist experimentell wesentlich aufwendiger, als der physikalische Nachweis von Insertionsmutationen durch das Transposon Tn3. Daher konnten im Rahmen dieser Arbeit aus der großen Anzahl von selektionierten Mini-F Kopiezahlmutanten jeweils nur 1-2 Plasmide für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt werden. An dieser Stelle muß betont werden, daß die Methode der in vitro Mutagenese von Plasmid-DNA mit Hydroxylamin sicherlich wesentlich effektiver ist als die in vivo Mutagenese durch andere chemische Agenzien, da die von anderen Arbeitsgruppen erwähnten Schwierigkeiten, Kopiezahlmutanten vom F-Faktor bzw. Mini-F zu erhalten (Cress und Kline, 1976; Ely und Staudenbauer, 1981), nicht auftraten.

Die Isolation von Mini-F Mutanten mit einem Cop^--Phänotyp erwies sich als unproblematisch. Es gelang jedoch nicht, in Analogie zu thermosensitiven Kopiezahlmutanten der Mini Plasmide von R6-5 (Danbara et al., 1981) oder R1drd-19 (Gustafsson und Nordström, 1978) nach einmaliger Mutagenese der Wildtyp-DNA thermosensitive Kopiezahlmutanten von Mini-F zu isolieren, die bei niedriger Wuchstemperatur eine dem Wildtyp entsprechende Kopiezahl aufweisen und deren Kopiezahl mit steigender Wuchstemperatur zunimmt.
Das dies kein Zufall zu sein scheint, darf aus der Tatsache gefolgert werden, daß letzterer Mutantentyp trotz unterschiedlicher Mutagenesetechniken anderer Arbeitsgruppen bisher für Mini-F nicht beschrieben wurde.

Die Vermutung, daß für die Ausprägung eines thermosensitiven bzw. supprimierbaren Cop-Phänotyps bei Mini-F eine Kombination verschiedener Mutationsereignisse erforderlich ist, konnte mit der Isolation und Charakterisierung der Mini-F Cop_{ts}-Mutanten

pJE3022 bzw. pJE139 (s. 3.1.2.) und der Rep-amber, Cop_{ts} Mehrfachmutanten pJE276-1 und pJE276-3 (s. 3.8.) bestätigt werden. Kartierungsexperimente zeigen, daß der Cop-Phänotyp beider Mutantentypen durch eine unterschiedliche Kombination von Mutationen im Genom hervorgerufen wird (s. Abb. 9).

Die zur physiologischen und genetischen Charakterisierung der isolierten Mini-F Cop- und Cop_{ts}-Mutanten durchgeführten Segregationskinetiken ergaben, daß die im Genom induzierten Punktmutationen keine negativen Auswirkungen auf stabile Erhaltung der getesteten Plasmide haben. Bei den von pJE3011 abstammenden Mutanten konnte sogar eine Stabilitätszunahme gegenüber dem Elterplasmid festgestellt werden, die auf einen Ausgleich der fehlenden und zwischen 46.35-49.3 F kartierten Verteilungsfunktionen von Mini-F (Ogura und Hiraga, 1983; Austin und Wierzbicki, 1983) durch die Kopiezahlerhöhung dieser Mutanten zurückgeführt wird (s. Tabelle 3).
Da sich das Inkompatibilitätsverhalten der analysierten Cop-Mutanten gegenüber dem Wildtyp ebenfalls nicht verändert hat, kann man vermuten, daß die Inkompatibilitätsfunktionen dieser Mutanten im Gegensatz zu den von Manis und Kline (1978) beschriebenen Tn3-Insertionsmutanten von Mini-F nicht mutagen verändert worden sind.

4.2 Die Gen-Loci der cop- und rep_{am}-Mutationen von Mini-F

Die Kartierung der cop und cop_{ts}-Mutation im Genom der exemplarisch ausgewählten Mini-F Mutanten pJE3021 und pJE3022 wurde durch die zuvorige Konstruktion des von pJE3022 abstammenden Klonierungsvektors pJE253 erheblich vereinfacht

bzw. erst möglich gemacht. Dazu wurden die begrenzenden PstI Schnittsequenzen (44.1-47.3 F) des Mini-F Teils von pJE3022 modifiziert und die Marker Gene von pJE3022 durch zwei Marker Gene von pBR325 ersetzt. Letztere Gene enthalten keine Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen PstI, XhoI und SmaI. Auf diese Weise wurde der wechselseitige in vitro Austausch homologer DNA-Fragmente der verschiedenen Mini-F Cop-Genotypen ermöglicht, ohne daß das Restmolekül in weitere Fragmente zerfällt.

Mit der Kartierung der cop-Mutation von pJE3021 bzw. von pJE3022, sowie der später induzierten cop-Mutationen von pJE276-1 und pJE276-3 in der Mini-F Region 45.35-45.88 F (s. Abb.9) konnten die Untersuchungsergebnisse von Seelke et al., (1982) bestätigt werden. Diese Arbeitsgruppe hatte die ebenfalls chemisch induzierten cop-Mutationen von fünf Mini-F Mutanten in der gleichen Mini-F Sequenz, die durch begrenzende SmaI (45.35 F) und PstI (45.88.F) Schnittstellen definiert ist, kartieren können.

Da anhand einer Sequenzanalyse des Basisreplikons von Mini-F (44.1-46.35 F), (Murotsu et al., 1981) in der Mini-F Region 45.25-46.0 F der Gen-Locus für das E-Protein lokalisiert werden konnte und Watson et al., (1982) zeigen konnten, daß das E-Protein von Mini-F für die Erhaltung dieses Plasmids essentiell ist, erschien es sicher, daß die cop-Mutationen der analysierten Mini-F Plasmide im Strukturgen des E-Proteins kartieren.

Die Sequenzierung der Mini-F Region von 45.35-45.88 F der Kopiezahlmutanten pJE3021, pJE3022, pJE276-1 und pJE276-3 ermöglichte die Identifizierung von 4 Punktmutationen in dem Gen-Locus

des E-Proteins mit der für eine Mutagenese durch Hydroxylamin typischen Spezifität (s. Abb. 13). Alle vier Mutationen resultieren aus einer Transition der Basenpaarung von G-C nach A-T. Drei dieser Mutationen führen zu einem Wechsel in der Aminosäuresequenz des E-Proteins von Mini-F. Die vierte, bei der thermosensitiven Kopiezahlmutante pJE3022 kartierte Mutation hat keinen Austausch in der Aminosäuresequenz zur Folge. Welche strukturellen Veränderungen die drei cop-Mutationen im E-Protein bewirken, ist gegenwärtig unbekannt. Da jedoch alle drei Mutationen in einer eng begrenzten Region kartieren, kann vermutet werden, daß in allen drei Fällen die gleiche Domäne des E-Proteins verändert wird.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Kopiezahlerhöhung der analysierten Cop-Mutanten von Mini-F durch ein mutiertes E-Protein bewirkt wird, stellt sich die Frage, ob das E-Protein in Analogie zu dem copB-Protein von R1drd-19 (Molin et al.,1981) ein negativ wirkendes Element der Replikationskontrolle von Mini-F (Repressor) oder wie das π-Protein von R6K (Inuzuka und Helinski, 1978) ein positiv wirkendes Element (Initiator) ist. Für die Beantwortung dieser Fragen ausschlaggebend waren die Kartierungsexperimente zum Nachweis einer zweiten amber-Mutation im Genom der Replikations-defekten Mini-F Doppelmutante pML31am3. (Die erste amber-Mutation konnte von Eichenlaub und Wehlmann (1980) im Gen-Locus des C-Proteins von Mini-F lokalisiert werden; s. Einleitung).
Die durchgeführten Kartierungsexperimente ergaben, daß die zweite amber-Mutation von pML31am3, ebenso wie die cop-Mutationen, im E-Gen von Mini-F kartiert (s. Abb. 13).
Da Mini-F Plasmide mit einem Defekt im E-Protein nur unter

supprimierenden Bedingungen replizieren können (Wehlmann und Eichenlaub, 1980; eigene Untersuchungen) und die Kopiezahl dieser Mutanten bei zunehmender Ausverdünnung des Suppressors (nach Erhöhung der Wuchstemperatur von E. coli RH2358$supF_{ts}$) nicht zu, sondern abnimmt (s. 3.8.), kann gefolgert werden, daß das E-Protein in einer Doppelfunktion sowohl in der Kopiezahlkontrolle als auch in der Replikationskontrolle von Mini-F involviert ist und zwar als positiv wirkendes Kontrollelement. Die dem Gen-Locus des E-Proteins von Mini-F von Kline und Seelke (1982) zugeschriebene negative Kontrollfunktion muß also abgelehnt werden.

Anhand der obigen Befunde kann das E-Protein, ebenso wie das C-Protein von Mini-F als ein positiv wirkendes Kontrollelement der Mini-F Replikation angesehen werden. Während das C-Protein aber nur für die Initiation der Replikation am Origin I (42.6 F) erforderlich zu sein scheint (Eichenlaub und Wehlmann, 1980), kontrolliert das E-Protein wahrscheinlich die Initiation an beiden Replikations-Startpunkten von Mini-F. Unterstützt wird diese Annahme durch ein Rekombinationsexperiment bei dem das KpnI-Fragment (43.1-46.8 F) des Mini-F Plasmids pSC138 in vitro gegen das homologe KpnI-Fragment der amber-Mutante pML31am3 ausgetauscht wurde. Es zeigte sich, daß die pSC138 Rekombinanten mit dem Wildtypallel des C-Proteins und dem mutierten Allel des E-Proteins nur unter supprimierenden Bedingungen replizieren können.(Das Experiment ist nicht im Resultateteil aufgeführt). Das C-Protein von Mini-F kann also einen Defekt im E-Protein nicht komplementieren.
Da bisher keine cop-Mutation innerhalb des C-Gens von Mini-F kartiert werden konnte

(Manis und Kline, 1978; Bergquist et al., 1981), läßt sich postulieren, daß das C-Protein im Unterschied zum E-Protein, nur eine Initiatorfunktion, aber keine Funktion in der Kopiezahlkontrolle von Mini-F hat.

Mit welchen Wirkloci das E-Protein von Mini-F vermutlich interagiert, und in welcher Weise die Synthese des E-Proteins reguliert zu werden scheint, soll im folgenden Kapitel diskutiert werden.

4.3. Modell zur Funktionsweise des E-Proteins von Mini-F

Um die Funktionsweise des E-Proteins von Mini-F charakterisieren zu können, wurden Komplementationsexperimente mit den *in vitro* konstruierten Mini-F Kointegraten pJE257 (pJE253 (cop^-_{ts}) und Mini-F Wildtyp) und pRE502 (pJE253 und die amber-Mutante pML31*am3*) durchgeführt (s. 3.7.). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das E-Protein von Mini-F *in trans* aktiv ist (siehe hierzu auch Tolun und Helinski, 1982) und daß das Wildtypallel des E-Gens gegenüber dem Allel der Kopiezahlmutante pJE253 dominant ist (Die Kointegrate zeigen den Cop-Phänotyp des Wildtyps).
Wie sich diese Ergebnisse mit einer positiven Funktionsweise des E-Proteins vereinbaren lassen soll im Folgenden erläutert werden. Hierfür müssen die Untersuchungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen miteinbezogen werden.

Einleitend war schon erwähnt worden, daß sich Mini-F auf ein autonom replizierendes Basisreplikon mit der F-Sequenz 44.1-46.35 reduzieren läßt (Murotsu et al., 1982).

Dieses Basisreplikon enthält den Origin II (45.1 F), die beiden charakteristischen Blöcke von 5 bzw. 4 19 bp langen repetitiven DNA-Sequenzen, die separat kloniert , die Inkompatibilität gegen F-Plasmide expremieren (im Folgenden als DNA "Repeats" bezeichnet) und das Gen für das E-Protein (E-Gen), (s. Abb. 2). Da bisher kein weiteres Protein aus dieser Mini-F Region nachgewiesen werden konnte und das Basisreplikon mit der Kopiezahl von Mini-F Wildtyp repliziert (Murotsu et al., 1981), kann vermutet werden, daß die Synthese des E-Proteins einer Autoregulation unterliegt und daß das E-Protein durch Interaktionen mit einem oder mehreren Loci in der Umgebung des Origins II die Mini-F Replikation kontrolliert.

Bei einem anderen Typ von Kopiezahlmutanten konnten die cop-Mutationen im incB/incC-Locus von Mini-F kartiert werden (Manis und Kline, 1978; Bergquist et al., 1981). Da man annehmen kann, daß eine Veränderung der Kopiezahl entweder durch eine Mutation im Regulatorprotein oder im Wirklocus dieses Proteins induziert werden kann, läßt sich postulieren, daß die beiden Blöcke von repetitiven DNA-Sequenzen, die das Strukturgen des E-Proteins einrahmen, die Wirkloci für das E-Protein darstellen. Bestärkt wird diese Annahme durch einen Vergleich mit anderen Replikationssystemen.
So soll z.B. das π-Protein des Plasmids R6K durch Bindung an acht 22 bp lange DNA-"Repeats" in der Origin Region von R6K seine eigene Synthese autoregulieren und als positives Kontrollelement die Replikation von R6K initiieren (Kolter et al., 1979; Germino und Bastia, 1983).
Im Falle des Bakteriophagen λ konnte gezeigt werden, daß das für die Initiation der Replikation essentielle O-Protein an vier 18 bp lange DNA-"Repeats" in der Origin-Region bindet

(Tsurimoto et al., 1981).

In Form eines Modells soll erläutert werden, in welcher Weise die Replikation und Kopiezahl von Mini-F durch Interaktionen des E-Proteins mit den beiden Blöcken von DNA-"Repeats" reguliert werden könnte (s. Abb.16). In diesem Modell haben die beiden Blöcke von DNA-"Repeats" die das E-Gen flankieren, eine Titratorfunktion für das E-Protein (s. hierzu auch Tsutsui et al., 1983). Ferner läßt sich postulieren, daß aufgrund der Lage des E-Gen Promoters die linksseitigen DNA-"Repeats" eine Operatorfunktion für die mRNA-Synthese des E-Proteins haben (Watson et al., 1982).
In dem vorgestellten Modell wird das E-Protein vor der Initiation eines Replikationszyklus kontinuierlich synthetisiert und lagert sich an die "Repeats" an. Erreicht die intrazelluläre Konzentration des E-Proteins einen bestimmten Grenzwert, so sind alle freien Bindungsstellen der "Repeats" mit Proteinmolekülen besetzt. Die Absättigung der linksseitigen "Repeats" hat zweierlei Auswirkung. Einerseits wird durch die Anlagerung des E-Proteins an diese "Repeats" eine weitere Synthese des E-Proteins in autoregulativer Weise reprimiert. Andererseits kann durch die Interaktion des E-Proteins mit den linksseitigen "Repeats" die Synthese eines RNA-Primers für die Mini-F Replikation initiiert werden. Ob der RNA-Primer in der im Modell gekennzeichneten Mini-F Region transkribiert wird, oder an anderer Stelle, muß noch näher untersucht werden. Nach dem obigen Modell wird die Anzahl der Initiationen der Mini-F Replikation und somit die Kopiezahl über die intrazelluläre Konzentration des E-Proteins und durch die Anzahl der E-Protein Bindestellen im Genom determiniert.

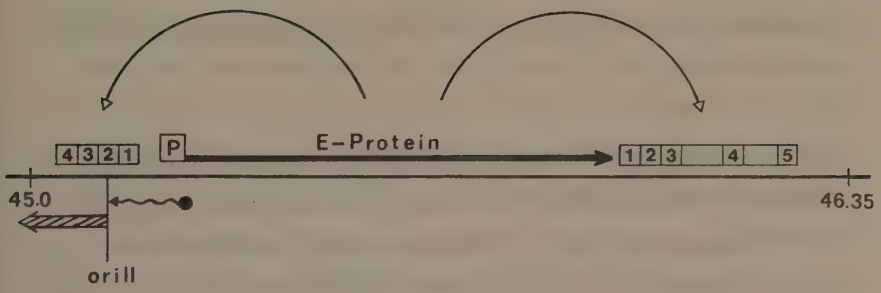


Abb.16: Modell zur Funktionsweise des E-Proteins von Mini-F. Abb.16 zeigt die Mini-F Region von 45.0-46.35 F. Eingezeichnet sind der Origin II (oriII), das Strukturgen des E-Proteins mit der Lage des Promoters (P) und der Transkriptionsrichtung. Die beiden numerierten Blöcke entsprechen den 4 bzw. 5 19 bp langen DNA-"Repeats", die das E-Gen flankieren. Die bogenförmigen Pfeile verdeutlichen die Affinität des E-Proteins zu den DNA-"Repeats". Die Wellenlinie mit Pfeilrichtung zum Origin II symbolisiert einen hypothetischen RNA-Primer. Die Replikationsrichtung ist durch einen schraffierten Pfeil gekennzeichnet.

Die jüngsten Untersuchungen von Tsutsui et al., (1983) unterstützen die obigen Modellvorstellungen bezüglich der Funktionsweise der DNA-"Repeats". Diese Arbeitsgruppe hat zeigen können, daß eine Deletion der rechtsseitig das E-Gen flankierenden 5 DNA-"Repeats" eine sechsfache Kopiezahlerhöhung dieser Mini-F Mutante zur Folge hat. Es kann vermutet werden, daß die verbliebenen 4 "Repeats" in diesem Fall wesentlich schneller mit E-Protein Molekülen abgesättigt werden, so daß während eines Zellzyklus mehrere Replikationsrunden initiiert werden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit induzierten cop-Mutationen im E-Protein verändern möglicherweise die Struktur dieses Proteins dahingehend, daß es zwar noch seine Initiatorfunktion erfüllen kann, jedoch nicht mehr seine Repressorfunktion, so daß die Synthese für das E-Protein konstitutiv wird.
Die Folge wäre ein Anstieg der intrazellulären Proteinkonzentration über den Grenzwert, eine beschleunigte Absättigung der 9 DNA-"Repeats" und eine vermehrte Initiationsrate der Mini-F Replikation während eines Zellzyklus.

Die beobachtete Abnahme der Kopiezahl von Mini-F Kopiezahlmutanten unter Komplementationsbedingungen (s. 3.7.) läßt sich nach dem obigen Modell so interpretieren, daß das intakte E-Protein des Wildtyps sowohl seine eigene, als auch die Synthese des mutierten E-Proteins reguliert und auf das Wildtyp-Niveau begrenzt. Die insgesamt verdoppelte Syntheserate des E-Proteins (2 Gen-Loci) bei den beiden Mini-F Kointegraten pJE257 und pRE502 kann durch die doppelte Anzahl von

DNA-"Repeats" ausgeglichen werden.
Es bleibt abzuwarten, ob sich die obige Modellvorstellung zur Funktionsweise des E-Proteins ganz oder teilweise bestätigen läßt.

Da das Plasmid Mini-F mit einer Kopiezahl von 1-2 Molekülen pro Zelle in seiner Replikation jedoch wesentlich präziser reguliert wird, als Plasmide mit hoher Kopiezahl, muß vermutet werden, daß außer dem E-Protein und dem incB/incC-Locus noch weitere Kontrollfunktionen existieren, die die Kopiezahl von Mini-F begrenzen. Die bei der thermosensitiven Kopiezahlmutante pJE3022 in der Mini-F Region 44.1-44.85 F' kartierte Mutation scheint auf einen weiteren Gen-Locus hinzuweisen, der in der Kopiezahlkontrolle von Mini-F involviert ist (s. nächstes Kapitel).
Eine Beeinflussung der Kopiezahlregulation von Mini-F durch Wirtsfunktionen ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, nachdem Cress und Kline (1976) eine Mutation im E. coli Chromosom mit der Bezeichnung pcn-24 nachweisen konnten, die zur einer Erhöhung der Kopiezahl eines F'lac pro Plasmids auf etwa 14 Kopien pro Zelle führt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Mini-F Replikation durch in trans aktive, positiv wirkende Kontrollelemente (C-Protein, E-Protein) reguliert wird. Damit scheint für den F-Faktor bzw. für Mini-F das in der Einleitung vorgestellte Replikationsmodell von Jacob et al., (1963) in seiner Grundaussage Gültigkeit zu haben.
Eine strenge Kopiezahlbegrenzung bei Plasmiden kann jedoch auch durch in trans aktive, negativ wirkende Kontrollelemente erfolgen. Dies zeigen Untersuchungen mit verschiedenen

Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppe F II. So inhibieren z.B. bei dem Antibiotikaresistenz-Faktor R1 eine nicht translatierte RNA (CopA-RNA) und ein Protein (CopB-Protein) die Expression eines Gens (repA), welches in positiver Weise für die Replikation von R1 erforderlich zu sein scheint (Light und Molin, 1982).

4.4. Die cop_{ts}-Mutation von Mini-F pJE3022

Die cop- und amber-Mutationen der charakterisierten Mini-F Mutanten kartieren im Gen-Locus des E-Proteins. Eine andere Mutation, die den thermosensitiven Cop-Phänotyp von pJE3022 induziert, konnte in einer 750 bp großen Mini-F Region zwischen 44.1-44.85 F lokalisiert werden (s.Abb.9). Der mutierte Gen-Locus selbst wurde bisher noch nicht identifiziert. Verschiedene Experimente zur Charakterisierung der cop_{ts}-Mutation von pJE3022 zeigen a) daß diese Mutation nicht als eine der von Eichenlaub (1979) beschriebenen rep_{ts}-Mutationen von Mini-F gedeutet werden kann (s.3.4.3.); b) daß diese Mutation sich nur in Kombination mit einer cop-Mutation im E-Protein auszuprägen scheint (s. 3.4.2.) und c) daß der mutierte Gen-Locus, wie am Beispiel von pLE702 gezeigt, vermutlich deletiert werden kann, ohne daß die Replikationsfähigkeit des Restmoleküls verloren geht.
Damit scheint dieser Gen-Locus keine essentielle Replikationsfunktion zu haben, sondern nur eine weitere Determinante der Kopiezahlkontrolle von Mini-F zu sein.
Zur Beantwortung der Frage, ob der mutierte Gen-Locus in der Mini-F Region 44.1-44.85 F für eine in trans aktive Funktion kodiert, oder eine funktionelle DNA-Sequenz, ähnlich dem

incB- oder incC-Locus darstellt, kann gegenwärtig nur die von Murotsu et al., (1981) bestimmte DNA-Sequenz dieser Mini-F Region analysiert werden.

Nach der Auffassung von Murotsu et al., (1981), kann aus der Mini-F Region 44.1-44.85 F kein größeres Polypeptid kommen, da sowohl die charakteristischen DNA-Polymerase Bindungssequenzen fehlen als auch zahlreiche Stopcodone in allen Leserasten vorhanden sind. Diese Aussage unterstützt die Kartierungsexperimente für Mini-F Proteine von Wehlmann und Eichenlaub (1980) und Komai et al., (1982).
Trotzdem kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß in dieser Region ein kleines, möglicherweise untranslatiertes Transkript kodiert wird, welches als Kontrollelement in der Mini-F Replikation agiert und das durch Mutation thermosensitiv wird.
Für die Plasmide ColE1 (Wong et al., 1982) und R1 (Stougaard et al., 1981) konnte gezeigt werden, daß Punktmutationen in regulatorisch aktiven RNA-Molekülen zu einer temperaturabhängigen Kopiezahlerhöhung dieser Plasmide führen. Man vermutet, daß entsprechende Mutationen diese RNA-Moleküle dahingehend verändern, daß die Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturen thermolabil wird.

Was bei einer weitergehenden Betrachtung der Mini-F Sequenz von 44.3-44.85F jedoch auffällt, sind ungewöhnlich zahlreiche Redundanzen (direkte DNA-"Repeats" und invertierte DNA-"Repeats"), von denen man annehmen kann, daß sie Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadelstrukturen) in der DNA auszubilden vermögen, die als Erkennungssignale für

Proteine fungieren.
Da Punktmutationen in regulatorisch aktiven RNA-Molekülen eine Temperatursensitivität dieser Moleküle bewirken können (s.o.), ist nicht auszuschließen, daß Punktmutationen in einer (oder mehreren) der zwischen 44.3 F und 44.85 F kartierten repetitiven Sequenzen die Signalfunktion dieser Sequenzen für korrespondierende Initiator-Proteine der Mini-F Replikation temperaturabhängig machen.
Figurski et al., (1978) haben zeigen können, daß die Mini-F Replikation vom Origin II (45.1 F) aus unidirektional erfolgt. Unter Berücksichtigung dieser Untersuchung läßt sich postulieren, daß beim Wildtyp von Mini-F die Signalfunktion der "Repeats" in der Region 44.1-44.85 F für die Ausbildung eines Initiationskomplexes zur bidirektionalen Replikation blockiert oder nur sehr schwach ausgeprägt ist. Die cop_{ts}-Mutation im Genom von pJE3022 verstärkt möglicherweise diese Signalfunktion. In diesem Fall könnte die Cop_{ts}-Mutante pJE3022 bei niedriger Wuchstemperatur durch eine bidirektionale Replikationsweise - oder durch eine ebenfalls denkbare Überinitiation der Replikation am Origin II - während eines Zellzyklus wesentlich häufiger replizieren, als die Cop-Mutante pJE3021. Die Folge wäre dann der bei 25°C Inkubationstemperatur gegenüber pJE3021 zu beobachtende Anstieg der Kopiezahl von pJE3022 auf etwa 40 Kopien pro Zelle (s. Tabelle 3).

Die Abnahme der Kopiezahl von pJE3022 bei 42°C Wuchstemperatur auf etwa 6 Kopien pro Zelle und damit unter den Meßwert von pJE3021, läßt sich folgendermaßen interpretieren. Durch eine Destabilisierung der Sekundärstruktur mutagen

veränderter DNA-"Repeats" geht die Signalfunktion dieser Mini-F Sequenz entweder völlig verloren oder wird dahingehend umgekehrt, daß die Ausbildung eines Initiationskomplexes am Origin II wesentlich gestört wird.
Die Folge ist eine verminderte Initiationsrate der Replikation von pJE3022 bei 42°C.

Bisher konnte für kein anderes Replikationssystem eine mutagene Veränderung in einer DNA-Sekundärstruktur beschrieben werden, die eine Kopiezahlveränderung dieses Replikons zur Folge hat. Es bleibt abzuwarten, ob die cop_{ts}-Mutation von pJE3022 tatsächlich anhand von Sequenzanalysen in einer der repetitiven Sequenzen der Mini-F Region von 44.1-44.85 F kartiert werden kann.

4.5. Mini-F Klonierungsvektoren mit modulierbarer Kopiezahl

Die von der Cop_{ts}-Mutante pJE3022 und der Amber-Mutante pML31am3 abstammenden Mini-F Vektoren pJE253, pJE276-1 und pJE276-3 zeigen, welchen Nutzen die Verwertung von Erkenntnissen der Grundlagenforschung für die Konstruktion von Spezialvektoren und die Wiederverwendung dieser Vektoren für die Grundlagenforschung haben kann.
Alle neukonstruierten Mini-F Vektoren konnten gegenüber dem früher konstruierten Mini-F Vektoren pMF3 (Manis und Kline, 1977) und pDF41 (Kahn et al., 1979) die 11.3 Kb bzw. 12.7 Kb groß sind und nur ein Marker Gen enthalten, deutlich verbessert werden. Die Klonierungsvektoren pJE253, pJE276-1 und pJE276-3 sind nur 6.5 Kb groß, sie enthalten zwei selektive Marker Gene und mehrere Einzelschnittstellen von

Restriktionsendonukleasen, in die DNA-Fragmente integriert werden können (s. Abb.7).
Die Attraktivität dieser Vektoren beruht jedoch auf ihrer Eigenschaft, die Kopiezahl in Abhängigkeit von der Wuchstemperatur zwischen 3 bzw. 6 Kopien (für pJE276-1 bzw. pJE253) und 50-60 Kopien pro Zelle variieren zu können. Damit besteht die Möglichkeit, große DNA-Mengen von den Vektoren und inserierten Genen zu isolieren. Andererseits kann die Expression eines klonierten Gens durch Manipulation der Wuchstemperatur innerhalb eines weiten Bereichs moduliert, und falls erforderlich auf ein Minimalniveau begrenzt werden. Da der Mini-F Vektor pJE253 entgegen der Fähigkeit eines intakten Mini-F Plasmids (Hogan et al., 1982) in E. coli Minizellen (Adler et al., 1967) segregiert (Eichenlaub und Ebbers, in Vorbereitung), besteht zusätzlich die Möglichkeit, sowohl Mini-F Proteine, als auch von klonierten Genen expremierte Polypeptide, nach der Methode von Frazer und Curtiss (1975) im Minizellensystem zu studieren.
Aufgrund dieser Eigenschaften sollten sich die konstruierten Mini-F Vektoren mit thermosensitiver Kopiezahl besser für die Insertionen von Genen eignen, deren Produkte in höherer Konzentration für die Wirtszelle letal sind, als Vektoren, die sich von einer thermosensitiven Kopiezahlmutante des Plasmids pSC101 (Hashimotoh-Gotoh et al., 1981) oder von der "run away" Replikationsmutante R1drd-19 (Bittner und Vapnek, 1981) ableiten und die mit einer Minimalzahl von 10-15 Kopien pro Zelle nicht so streng in ihrer Kopiezahl begrenzt werden können, wie die cop_{ts}-Vektoren von Mini-F.

4.6. Ausblick

Zukünftige Untersuchungen sollten darauf abzielen, die zuvor postulierte Funktionsweise des E-Proteins zu verifizieren, dh. die Interaktionen des E-Proteins mit repetitiven Signalsequenzen im Mini-F Genom zu prüfen.

1) Dazu könnte versucht werden, das E-Gen von Mini-F *in vitro* mit dem Gen eines leicht nachweisbaren Marker Proteins (z.B. ß-Galaktosidase) zu fusionieren, das fusionierte Genprodukt zu reinigen und anschließend für *in vitro* Bindungsstudien mit Mini-F DNA einzusetzen. Solche Experimente konnten erfolgreich mit dem π-Protein von R6K durchgeführt werden (Germino und Bastia, 1983).

2) Nach wie vor sollte versucht werden, in Analogie zu dem *in vitro* Replikationssystem von R6K (Inuzuka und Helinski, 1978) oder R1 (Diaz und Nordström, 1981) ein für Mini-F geeignetes *in vitro* Replikationssystem zu entwickeln, um die Wirkungsweise von Proteinen und die Signalfunktion von DNA-Sequenzen für die Mini-F Replikation direkt untersuchen zu können.

Möglicherweise eignen sich in dieser Arbeit charakterisierte Mini-F Kopiezahlmutanten bzw. die von ihnen abgeleiteten Vektoren wesentlich besser für die Entwicklung eines solchen *in vitro* Systems, als das Mini-F Wildtyp Plasmid.

3) Um die zwischen 44.1-44.85 F kartierte cop_{ts}-Mutation von Mini-F pJE3022 einer definierten Replikationsfunktion zuordnen zu können, wird eine vergleichende Sequenzierung der DNA-Region von 44.1-44.85 F von konstitutiven und thermosensitiven Kopiezahlmutanten erforderlich sein.

4) Ferner sollten elektronenmikroskopische Untersuchungen von

Replikationsintermediaten Aufschluß darüber geben können, ob bei der Kopiezahlmutante pJE3022 die Replikation ausgehend vom Origin II in Abhängigkeit von der Wuchstemperatur alternativ bidirektional oder unidirektional erfolgt und ob bei den von pSC138 abstammenden Kopiezahlmutanten die Replikation weiterhin am Origin I (42.6 F) initiiert wird.

5) Die Verwendungsmöglichkeit der konstruierten Mini-F Vektoren für eine weiterführende Charakterisierung der Replikationsfunktionen von Mini-F, unter Umgehung der Inkompatibilitätsbarriere und für die Expression anderer Gene, deren Produkte in höherer Konzentration von der Wirtszelle nicht toleriert werden, wurde schon zuvor betont.

5. Zusammenfassung

Nach in vitro Mutagenese mit Hydroxylamin konnten von dem Mini-F Plasmid pSC138 und von dem im Mini-F Teil auf 3.2 Kb reduzierten Mini-F Derivat pJE3011 sowohl Cop- als auch Cop^-_{ts}-Mutanten isoliert werden.

Während die Kopiezahl der untersuchten Cop-Mutanten von Mini-F gegenüber dem Wildtyp um etwa das zehnfache erhöht ist, verändert sich die intrazelluläre Kopiezahl der analysierten Mini-F Cop_{ts}-Mutanten in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur zwischen 50-60 Kopien bei 25°C und etwa 6 Kopien bei 42°C.

Alle untersuchten Kopiezahlmutanten von Mini-F expremieren die F-spezifische Inkompatibilität und bleiben stabil in ihren Wirtsbakterien erhalten.

Mit Hilfe von in vitro Rekombinationsexperimenten und durch Sequenzanalysen wurden die cop-Mutationen von drei Kopiezahlmutanten und die amber-Mutation einer Replikations-defekten Mini-F Mutante untersucht. Die cop-Mutationen und die amber-Mutation kartieren im Gen-Locus des E-Proteins von Mini-F. Anhand der unterschiedlichen Phänotypen von Cop- und Amber-Mutanten konnte auf eine essentielle und positive Funktion des E-Proteins für die Replikation und Kopiezahlkontrolle von Mini-F geschlossen werden.
In dem Genomabschnitt 44.1-44.85 F einer thermosensitiven Kopiezahlmutante von Mini-F (pJE3022) konnte eine andere Mutation kartiert werden, die den Cop^-_{ts}-Phänotyp dieser Mutante verursacht. Die Position der Mutation in der DNA-Sequenz 44.1-44.85 F wurde noch nicht bestimmt. Die eventuelle Funktion des mutierten Gen-Locus wird diskutiert.

Anhand von Komplementationsexperimenten mit einem Kointegrat aus Mini-F Wildtyp und einer Cop_{ts}-Mutante von Mini-F konnte gezeigt werden, daß das Wildtypallel des E-Gens über das mutierte Allel der Cop_{ts}-Mutante dominant ist, so daß die Kopiezahl der Mutante unter Komplementationsbedingungen auf das Niveau des Wildtyps begrenzt wird.
Anhand der erhaltenen Versuchsdaten und unter Miteinbeziehung anderer funktioneller Elemente der Kopiezahlkontrolle von Mini-F wurde ein Modell für die Funktionsweise des E-Proteins von Mini-F erstellt.

Ausgehend von einer Cop_{ts}- und Rep_{am}-Mutante von Mini-F wurden verschiedene Mini-F Klonierungsvektoren konstruiert, deren Kopiezahl über die Wuchstemperatur der Wirtsbakterien moduliert werden kann. Diese Vektoren konnten nicht nur erfolgreich für die Kartierung der cop- und rep_{am}-Mutationen von Mini-F verwendet werden, sondern sie eignen sich auch zur Insertion und Expression anderer Gene.

6. Literaturverzeichnis

Adler, B.J., W.D. Fisher, A. Cohen, A.A. Hardigree (1967) Miniature Escherichia coli cells deficient in DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 321-326.

Andresdottier, V. und M. Masters (1978) Evidence that F'lac replicates asynchronously during the cell cycle of Escherichia coli B/r. Molec. Gen. Genet. 163, 205-212.

Austin, S. und A. Wierzbicki (1983) Two mini-F encoded proteins are essential for equipartition. Plasmid 10, 73-81.

Beck, E. und E. Bremer (1980) Nucleotide sequence of the gene ompA coding the outer membrane protein II of Escherichia coli K-12. Nucl. Acids Res. 8, 3011-3024.

Bergquist, P.L., R.A. Downard, P.A. Caughey, R.C. Gardner, H.E.D. Lane (1981) Analysis of mini-F plasmid replikation by transposition mutagenesis. J. Bact. 147, 888-899.

Bergquist, P.L., A.F. Jamieson, R.C. Gardner, D. Lane (1980) Replication mutants of the F-Plasmid of Escherichia coli K12. I. Isolation and characterization of temperature-sensitive replication mutants of F'gal. Plasmid 3, 165-178.

Birnboim, H.C. und J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.

Bittner, M. und D. Vapnek (1981) Versatile cloning vectors derived from the runaway-replication plasmid pKN402. Gene 15, 319-329.

Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113.

Bolivar, F. (1978) Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules. Gene 4, 121-136.

Burger, K.J., J.Steinbauer, G. Röhlich, R. Kollek, W. Goebel (1981) Copy number control and incompatibility of plasmid R1: Identification of a protein that seems to be involved in both processes. Mol. Gen. Genet. 182, 44-52.

Cairns, J. (1963) The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. J. Mol. Biol. 6, 208-213.

Chang, A.C.Y. and S.N. Cohen (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134, 1141-1156.

Clark, A.J. und G.J. Warren (1979) Conjugal transmission of plasmids. Ann. Rev. Genet. 13, 99-125.

Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, L. Hsu (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114.

Collins, J. und H.J. Brüning (1978) Plasmids useble as gene-cloning vectors in an in vitro packaging by coliphage λ: "Cosmids". Gene 4, 85-107.

Collins, J., (1977) Gene cloning with small plasmids. Curr. Topics in Microbiol. and Immunol. 78, 121-170.

Cress, D.E. und B.C. Kline (1976) Isolation and characterization of Escherichia coli chromosomal mutants affecting plasmid copy number. J. Bact. 125, 635-642.

Cullum, J. und P. Broda (1979) Rate of segregation due to plasmid incompatibility. Genet. Res. Camb. 33, 61-79.

Cuzin, F. und F. Jacob (1967) Mutations de l'episome F d' Escherichia coli K12. II. Mutants à replication thermosensible. Ann. Inst. Pastuer Paris 112, 398-418.

Danbara, H., G. Brady, J.K. Timmis. K.N. Timmis (1981) Regulation of DNA replication: The "target" determinant of the replication control elements of plasmid R6-5 lies within a control element gene.

Datta, N. (1979) Plasmid classification: Incompatibility grouping. In: Plasmids of Medical Enviromental and Commercial Importance (K.N. Timmis; A.Pühler eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 3-12.

Davidson, N., R.C. Deonier, S. Hu, E. Ohtsubo (1975) Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of Escherichia coli. X. Deoxyribonucleic acid sequence organization of F and F-primes and the sequences involved in Hfr formation. In: Microbiology-1974. Am. Soc. for Microbiol. Washington D.C., pp. 56-65.

Delcuve, G., T. Cabezon, A. Ghuysen, A. Herzog, A. Bollen (1977) Amber mutations in Escherichia coli essential genes: Isolation of mutants affected in the ribosome. Mol. Gen. Genet. 157, 149-153.

Diaz, R. und K. Nordström (1981) Plasmid R1 DNA replication dependent on protein synthesis in cell-free extracs of Escherichia coli. Nature 289, 326-328.

Ebbers, J. und R. Eichenlaub (1981) Complementation of replication deficient deletion derivatives of plasmid mini-F. J. Bact. 147, 736-743.

Eichenlaub, R., H. Wehlmann, J. Ebbers (1981) Plasmid mini-F encoded functions involved in replication and incompatibility. In: Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids (S. Levy, ed.) Plenum Press, pp.327-336.

Eichenlaub, R., D. Figurski, D.R. Helinski (1977) Bidirectional replication from a unique origin in a mini-F plasmid. Procl. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1138-1141.

Eichenlaub, R. (1979) Mutants of the mini-F plasmid pML31 thermosensitiv in replication. J. Bact. 138, 559-566.

Eichenlaub, R. und H. Wehlmann (1980) Amber-mutants of plasmid mini-F defective in replication. Mol. Gen. Genet. 180, 201-204.

Ely, S. und W.L. Staudenbauer (1981) Regulation of plasmid DNA synthesis: Isolation and characterization of copy number mutants of mini R6-5 and mini-F plasmids. Mol. Gen. Genet. 181, 29-35.

Enquist, L. und N. Sternberg (1979) In vitro packaging of λdam vectors and their use in cloning DNA fragments. In: Methods in Enzymology, Vol., 68 (ed. R. Wu) 281-289.

Frame, R. und J.O. Bishop (1971) The number of sex-factors per chromosome in Escherichia coli. Biochem. J. 121, 93-103.

Frazer, A.C. und R. Curtiss III (1975) Production, properties and utility of bacterial minicells. Curr. Topics in Microbiol. and Immunol. 69, 1-84.

Freese, E., E. Bautz, E. Bautz-Freese (1961) The chemical and mutagenic specifity of hydroxylamine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 845-855.

Gardner, R.C., L.Malcolm, P.L. Bergquist, H.E.D. Lane (1982) IncD, agenetic locus in F responsible for incompatibility with several plasmids on the IncFI group. Mol.Gen.Genet. 188, 345-352.

Gardner, R.C., A. Penelope, D. Caughey, D. Lane, P.L. Bergquist (1980) Replication mutants of the F-plasmid of Escherichia coli. II. Cloned replication regions of temperature-sensitive mutants. Plasmid 3, 179-191.

Gelfand, D.H., H.M. Shepard, P.H. O`Farell, B. Polisky (1978) Isolation and characterization of a ColE1-derived plasmid copy-number mutant. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 5869-5873.

Germino, J. und D. Bastia (1983) The replication initiator protein of plasmid R6K tagged with β-Galactosidase shows sequence-specific DNA-binding. Cell 32, 131-140.

Gilbert, W. und D. Dressler (1968) DNA replication: The rolling circle model. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 473-484.

Goebel, W. und H. Schrempf (1972) Replication of plasmid DNA in temperature sensitive DNA replication mutants of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Acta 262, 32-41.

Gronenborn, B. und J. Messing (1978) Methylation of single-stranded DNA in vitro introduces new restriction endonuclease cleavage sites. Nature 272, 375-377.

Gustafsson, P., K. Nordström, J.W. Perram (1978) Selection and timing of replication of plasmid R1drd-19 and F'lac in Escherichia coli. Plasmid 1, 187-203.

Hansen, F.G. und K. von Meyenburg (1979) Characterization of the dnaA, gyrB and other genes in the dnaA region of the Escherichia coli chromosome on specialized transducing phages tna. Mol. Gen. Genet. 175, 135-144.

Hashimotoh-Gotoh, T., F.C.H. Franklin, A. Nordheim, K.N. Timmis (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. Gene 16, 227-235.

Hirota, Y., M. Gefter, L. Mindich (1972) A mutant of Escherichia coli defective in DNA polymerase II activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3238-3242.

Hagan, J.E., B.C. Kline, S.C. Levy (1982) Regions on the F-plasmid which affect plasmid maintenance and the ability to segregate into Escherichia coli minicells. Plasmid 8, 36-44.

Hohn, B. und K. Murray (1977) Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 3259-3265.

Hu, S., E. Ohtsubo, N. Davidson (1975) Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of Escherichia coli: Structure of F13 and related F-primers. J. Bact. 122, 749-763.

Inuzuka, M. und D.R. Helinski (1978) Requirement of a plasmid-encoded protein for the replication in vitro of plasmid R6K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5381-5385.

Itoh, T. und J. Tomizawa (1980) Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2450-2454.

Jacob, F., S. Brenner, F. Cuzin (1963) On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329-348.

Kahn, M., R. Kolter, C. Thomas, D. Figurski, R. Meyer, E. Remaut, D.R. Helinski (1979) Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColE1, F, R6K and RK2. Methods Enzym. 68, 268-278.

Kahn, M.L., D. Figurski, L. Itoh, D.R. Helinski (1979) Essential regions for replication of a stringent and a relaxed plasmid in Escherichia coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 99-103.

Kennedey, N. Beutin, L. Achtman, R. Skurray, U. Rahmsdorf, P. Herrlich (1977) Conjugation proteins encoded by the F sex factor. Nature 270, 580-585.

Kleckner, N. (1977) Translocatable elements in Procaryotes. Cell 11, 11-23.

Kline, B.C. (1973) Role of DNA transcription in the initiation of Escherichia coli sex factor (F) DNA replication. Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 280-288.

Kline, B.C. (1979) Incompatibility between F'lac, R386, and F: pSC101 recombinant plasmids: The specifity of F incompatibility genes. Plasmid 2, 437-445.

Kline, B.C. und D. Lane (1980) A proposed system for nomenclature for incompatibility genes of the Escherichia coli sex factor, plasmid F. Plasmid 4, 231-232.

Kline B.C. und S. Palchaudhuri (1980) Genetic studies of F plasmid maintenanse genes. Plasmid 4, 281-291.

Kline, B.C. und R.W. Seelke (1982) Genetic evidence that control of F replication is negative. Mol Gen. Genet. 187, 218-224.

Kollek, R., W. Oertel, W. Goebel (1978) Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("Basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1. Mol. Gen. Genet. 162, 51-57.

Kolter, R. und D.R. Helinski (1978) Construction of plasmid R6K derivates in vitro: Characterization of the R6K replication region. Plasmid 1, 571-580.

Kolter, R., M. Inuzuka, D.R. Helinski (1978) Trans-complementation dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. Cell 15, 1199-1208.

Kolter, R und D.R. Helinski (1979) Regulation of initiation of DNA replication, Ann. Rev. Genet. 13, 355-391.

Komai, N., T. Nishizawa, Y. Hayakawa, T. Murotsu, K. Matsubara, (1982) Detection and mapping of six mini-F encoded proteins by cloning analysis of dissected mini-F segments. Mol. Gen. Genet. 186, 193-203.

Lane, H.E.D. (1981) Replication and incompatibility of F and plasmids in the IncFI group. Plasmid 5, 1001126.

Light, J. und S. Molin (1981) Replication control fuctions of plasmid R1 act as inhibitors of expression of a gene required for replication. Mol. Gen. Genet. 184, 56-61.

Light, J. und S. Molin (1982) The sites of action of the two copy number control functions of plasmid R1. Mol. Gen. Genet. 187, 486-493.

Lovett, M.A., L. Katz, D.R. Helinski (1974) Unidirectional replication of plasmid ColE1 DNA and relation of the origin-terminus to the nicked site in the ColE1 relaxation complex. Nature 251, 337-340.

Lovett, M.A., R.B. Sparks, D.R. Helinski (1975) Bidirectional replication of plasmid R6K DNA in Escherichia coli: Correspondence between origin of replicarion and position of single-strand break in relaxed complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2905-2909.

Lovett, M.A. und D.R. Helinski (1976) A method for the isolation of the replication region of a bacterial replicon: Construction of a mini-F Km plasmid. J. Bact. 127, 982-987.

Manis, J. und B. Kline (1977) In vitro rearrangement and deletion of plasmid DNA sequences: The isolation and partial characterization of a novel F-controlled plasmid cloning vehicle. Mol. Gen. Genet. 152, 175-182.

Manis, J.J. und B.C. Kline (1978) F plasmid incompatibility and copy number genes: Their map locations and interactions. Plasmid 1, 492-507.

Matsubara, K. (1976) Genetic structure and regulation of plasmid λdv. J. Mol. Biol. 102, 427-439.

Messing, J. und J. Vieira (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. Gene 19, 269-276.

Meyer, R.J. und D.R. Helinski (1977) Unidirectional replication of the P-group plasmid RK2. Biochem. Biophys. Acta. 478, 109-113.

Messer, W., L. Dankwarth, R. Tippe-Schindler, J.E. Womack, G. Zahn (1975) Regulation of the initiation in Escherichia coli. Isolation of I-RNA and the control of I-RNA synthesis. ICN-UCLA Sym. on Molecular and Cellular Biology III, pp. 602-617.

Miki, T., A.M. Easton, R.H. Rownd (1980) Cloning of replication incompatibility and stability functions of R plasmid NR1. J. Bacteriol. 141, 87-99.

Miller, J., J. Manis, B. Kline, A. Bishop (1978) Nonintegrated plasmid-folded chromosome complexes: Genetic studies on formation and possible relationship to plasmid replication. Plasmid 1, 273-283.

Miller, J.R. und B.C. Kline (1979) Biochemical characterization of non integrated plasmid-folded chromosome complexes: Sex Factor F and the Escherichia coli Nucleotid. J. Bacteriol. 137, 885-890.

Molin, S., P. Stougaard, J. Light, M. Nordström, K. Nordström (1981) Isolation and characterization of new copy mutants of plasmid R1, and identification of a polypeptide involved in copy number control. Mol. Gen. Genet. 181, 123-130.

Morris, C.F., H. Hashimoto, S. Mickel, R. Rownd (1974) Round of replication mutant of a drug resistance factor. J. Bacteriol. 118, 855-866.

Murotsu, T., K. Matsubara, H. Sugisaki, M. Takanami (1981) Nine unique repeating sequences in a region essential for replication and incompatibility of the mini-F plasmid. Gene 15, 257-271.

Nishimura, Y., L. Caro, C.M. Berg, Y. Hirota (1971) Chromosome replication in Escherichia coli IV. Control of chromosome replication and cell division by an integrated episome. J. Mol. Biol. 55, 441-456.

Nordström, K., L.C. Ingram, A. Lundbäck (1972) Mutations in R factors of Escherichia coli causing an increased number of R-factor copies per chromosome. J. Bact. 110, 562-569.

Nordström, K., S. Molin, H. Aagaard-hansen (1980) Partitioning of plasmid R1 in Escherichia coli. I.Kinetics of loss of plasmid derivates delected of the par region. Plasmid 4, 215-227.

Novick, R.P., L. Wyman, D. Bouanchaud, E. Murphy (1975) Plasmid life cycles in Staphylococcus aurens. In: Am. Soc. for Microbiol. Washington D.C., pp. 56-65.

Novick, R.P. und F.C. Hoppensteadt (1978) On plasmid incompatibility. Plasmid 1, 421-434.

Ogura, T. und S. Hiraga (1983) Partition mechanism of F plasmid: Two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. Cell 32, 351-360.

Peacock, A.C. und C.W. Dingman (1968) Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. Biochemistry 7, 668-674.

Pritchard, R.H., P.T. Barth, J. Collins (1969) Control of DNA synthesis in bacteria. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 19, 263-297.

Pritchard, R.H., M.G. Chandler, J. Collins (1975) Independence of F replication and chromosome replication in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 138, 143-155.

Projan, S.J., S. Carleton, R.P. Novick (1983) Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. Plasmid 9, 182-190.

Sanger, F. und A.R. Coulson (1978) The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. FEBS Letters 87, 107-114.

Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

Seelke, R.W., B.C. Kline, J.D. Trawick, G.D. Ritts (1982) Genetic studies of F plasmid maintenance genes involved in copy number control incompatibility and partitioning. Plasmid 7, 163-179.

Sharp, P.A., M.T. Hsu, E. Ohtsubo und N. Davidson (1972) Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of Escherichia coli. I. Structure of F-prime factors. J. Mol. Biol. 71, 471-497.

Sherrat, D.J. und D.R. Helinski (1973) Replication of colicinogenic factor E1 in Escherichia coli. Properties of newly replicated supercoils. Eur. J. Biochem. 37, 95-99.

Skurray, R.A., A.J. Clarck, B.E. Uhlin, H. Nagaishi, S. Hua (1978) F sex factor: Physical and functional analysis of cloned EcoRI DNA fragments. In: Microbiology 1978 (D. Schlessinger, ed.) Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C., pp. 192-196.

Smith, A.J.H. (1980) DNA sequence analysis by primed synthesis. In: Methods in Enzymology (eds. L. Grossmann, K. Moldave) Vol. 65, pp. 560-580.

Sompayrac, L. und O. Maaløe (1973) Autorepressor model for control of DNA replication. Nature 241, 133-135.

Sparks, R. und D.R. Helinski (1979) Association of cellular membrane of Escherichia coli minicells with the origin/terminus region of replication of plasmid ColE1 DNA. Nature 277, 572-575.

Staudenbauer, W.L. (1978) Structure and replication of the colicin E1 plasmid. Current Topics Microbiol. Immunol. 83, 93-156.

Stougaard, P., S. Molin, K. Nordström (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 6008-6012.

Tait, R.C., R.L. Rodriguez, R.W. West (1980) The rapid purification of T4 DNA ligase from a λT4 lig lysogen. J. Biol. Chem. 225, 813-815.

Thompson, R. und P. Broda (1973) DNA polymerase III and the replication of F and ColVBtrp in Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 127, 255-258.

Timmis, K., F. Cabello, S.N. Cohen (1975) Cloning, isolation and characterization of replication regions of complex plasmid genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2242-2246.

Timmis, K.N., S.N. Cohen, F.C. Cabello (1978) DNA cloning and the analysis of plasmid structure and function. Progress in Molecular and Subcellular Biology (F.E. Hahn, ed.) 6, 1-58.

Tolun, A. und D.R. Helinski (1982) Separation of the minimal replication region of the F plasmid into a replication origin segment and a trans-acting segment. Mol. Gen. Genet. 186, 372-378.

Tolun, A. und D.R. Helinski (1982) Direct repeats of the F plasmid incB region express F incompatibility. Mol. Gen. Genet. 186, 372-377.

Tsurimoto, T. und K. Matsubara (1981) Purification of bacteriophage λ O protein that specifically binds to the origin of replication. Mol. Gen. Genet. 181, 325-331.

Tsutsui, H., A. Fujiyama, T. Murotsu, K. Matsubara (1983) Role of nine repeating sequences of mini-F genom for expression of F-specific incompatibility phenotype and copy number control. J. Bact. 155, 337-344.

Uhlin, B.E. und K. Nordström (1978) A runaway-replication mutant of plasmid R1drd-19: Temperature-dependent loss of copy number control. Mol. Gen. Genet. 165, 167-179.

Van Brunt, J., B.T. Waggoner, M.L. Pato (1977) Reexamination of F plasmid replication in a dnaC mutant of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 150, 285-292.

Watson, L.A., S.H. Phua, P.L. Bergquist, H.E.D. Lane (1982) An M_r29000 protein is essential for mini-F maintenance. Gene 19, 173-178.

Wehlmann, H. und R. Eichenlaub (1981) Analysis of transcrips from plasmid mini-F by electron microscopy of R-loops. Plasmid 5, 259-266.

Wehlmann, H. und R. Eichenlaub (1980) Plasmid mini-F encoded proteins. Mol.Gen.Genet. 180, 205-211.

Weisblum, B., M. Graham, T. Gryczan, D. Dubnau (1979) Plasmid copy number control: Isolation and charakterization of high-copy number mutants of plasmid pE194. J. Bact. 137, 635-643.

Willets, N. und R. Skurray (1980) The conjugation system of F-like plasmids. Ann. Rev. Genet. 14, 41-76.

Wong, E.M., M.A. Muesing, B. Polisky (1982) Temperature-sensitive copy number mutants of ColE1 are located in an untranslated region of the plasmid genome. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 3570-3574.

Zahn, G. und W. Messer (1979) Control of the initiation of DNA replication in Escherichia coli. II. Function of the dnaA product. Mol. Gen. Genet. 168, 197-209.

Schriftenverzeichnis

Ebbers, J. (1979)
Untersuchung des Plasmids Mini-F:
Bestimmung essentieller Regionen für
Replikation und Inkompatibilität.
Diplomarbeit an der Abteilung Biologie der
Ruhr-Universität Bochum,
Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen

Eichenlaub, R., Wehlmann, H., Ebbers, J. (1980)
Untersuchung der Replikation des Plasmids Mini-F.
Heidelberger DNA-Tagung, 08. - 11.05.1980,
Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,
Heidelberg, Abstract

Eichenlaub, R., Wehlmann, H., Ebbers, J. (1981)
Plasmid mini-F encoded functions involved in
replication and incompatibility.
In: "Molecular Biology, pathogenicity, and ecology of
bacterial plasmids" (S. Levy, R. Clowes, and E. Koenig, eds.)
Plenum Press, pp. 327 -336

Ebbers, J. und Eichenlaub, R. (1981)
Complementation of replication-deficient deletions
derivatives of plasmid mini-F
J. Bacteriol. 147, 736 - 743

Ebbers, J., Helsberg, M., Eichenlaub, R.
Characterization of replication mutants of plasmid mini-F:
Evidence that the 29K protein of mini-F is involved in
replication and copy number control.
In Vorbereitung

Eichenlaub, R., Ebbers, J.
Special purpose cloning vectors derived from plasmid
mini-F
In Vorbereitung

Lebenslauf

25.09.1952	geboren in Marl (Krs. Recklinghausen)
1959 - 1963	Besuch der Volksschule in Marl
1963 - 1973	Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Marl - Abitur
Okt. 1973	Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum für die Fächer Biologie, Geschichte und Sportwissenschaft
1975	Diplomprüfung in Biologie
Feb. 1980	Diplomhauptprüfung Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie/Biophysik und Organische Chemie Diplomarbeit: Untersuchung des Plasmids Mini-F: Bestimmung essentieller Regionen für die Replikation und Inkompatibilität
März 1980	Wissenschaftlicher Angestellter Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen der Ruhr-Universität Bochum